

# **Sulfokonjugierte Sympathomimetika**

## **in der Dopinganalytik**

Synthese, Charakterisierung und Analyse

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Anne-Katrin Laura Orlovius**

aus Kassel

Bonn 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schänzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Gütschow

Tag der Promotion: 21.03.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer angefertigt. Die Zweitbetreuung erfolgte durch Prof. Dr. Michael Gütschow, Pharmazeutisches Institut, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.



## Danksagung

Zu besonderem Dank bin ich den Professoren, die meine Promotion betreut haben, verpflichtet. So danke ich Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche Anleitung und die Aufnahme im Institut für Biochemie. Dort habe ich eine hervorragende wissenschaftliche Ausbildung erhalten, habe mehr als je geahnt gelernt und wurde mit Verantwortung betraut.

Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung und seine stete Bereitschaft konstruktiv über meine Arbeit zu diskutieren und sie voranzubringen. Seine Wegbegleitung bereits ab dem 1. Studiensemester hat für eine vertrauensvolle Basis gesorgt. Herr Prof. Gütschow hat wesentlichen Anteil daran, dass das Interesse an der Forschung in mir geweckt wurde. Auch für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich Herrn Prof. Gütschow und seinem Arbeitskreis.

Herrn Dr. Sven Guddat, der bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, danke ich für die Betreuung im Labor, für das Motivieren, die eingehende Korrektur dieser Arbeit und dass er mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Für die gute fachliche Zusammenarbeit, Hilfestellung und Beratung zu den verschiedenen Projekten danke ich außerordentlich Herrn Prof. Dr. Mario Thevis. Für motivierende Worte und die Erinnerung daran, die Realität im Auge zu behalten, danke ich Herrn Dr. Hans Geyer. Frau Prof. Dr. Maria Parr danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Meinen lieben Kollegen des Instituts für Biochemie danke ich für das gute Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft. Sie haben mir viele Aufgaben abgenommen und mich auch in angespannter und gestresster Stimmung ertragen. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Christian Görgens für die verlässliche Unterstützung im Routinebetrieb. Meine Promotionszeit habe ich dank Christina, Christian, Fips, Gingin, Hanni, Kasimir und Naddel mit Burgerabenden, Käsebrot, FroYo und Eiszeiten abseits des Arbeitsalltags sehr genossen.

Frau Dr. Maxie Kohler und Herrn Dr. Simon Beuck danke ich für die vielen inhaltlichen Anregungen zu den Veröffentlichungen und zu meiner Arbeit, sowie die vielen fröhlichen Ablenkungen.

Meinen lieben Freundinnen Carina, Doro und Jenny danke ich für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit, die ständige Bereitschaft wissenschaftliche Themen zu beleuchten und das stete Rücken stärken in allen Lebenslagen. Ihr seid die Größten!

In Gedenken an Malle war es mir möglich, mich immer wieder neu zu motivieren, mir selbst treu zu bleiben und mich nicht in all der Arbeit zu verlieren. Auch durch sie bin ich die geworden, die ich bin und dafür bin ich dankbar.

Von Herzen danke ich meinen Eltern für Ihre grenzenlose, uneingeschränkte Unterstützung in jeglicher Hinsicht, sowie für ihr Verständnis und ihre Geduld während meiner gesamten Ausbildung. Meiner lieben Omi Lorli danke ich für ihren immerwährenden Zuspruch, ihr Vertrauen und ihre Gelassenheit. Meinem Bruder Steffen, seiner Frau Rebecca und Tochter Ava danke ich für die Glückseligkeit, die sie mir bereiten.

Nicht zuletzt danke ich Oliver für seinen Beistand, seine Motivation, seine Bereitschaft Launen auszuhalten und für all das, was man mit Worten nicht ausdrücken kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Literaturbesprechung</u></b>	<b><u>3</u></b>
<b>2.1</b>	<b>Pharmakologie</b>	<b>3</b>
2.1.1	Adrenorezeptoren und Catecholamine	3
2.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehung	8
2.1.3	Metabolismus von Sympathomimetika	10
2.1.3.1	Etilefrin	10
2.1.3.2	Octopamin	10
2.1.3.3	Terbutalin	11
2.1.3.4	Bambuterol	11
2.1.3.5	Fenoterol	12
2.1.3.6	Salbutamol	13
2.1.4	Sulfonierung als Entgiftung	13
<b>2.2</b>	<b>Chemische Synthese von Sulfokonjugaten</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b><i>In vitro</i>-Metabolismus</b>	<b>20</b>
<b>2.4</b>	<b>Analytik von Sulfokonjugaten</b>	<b>21</b>
2.4.1	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie	21
2.4.1.1	Atmosphärendruck-Ionisation	21
2.4.1.2	Tandem-Massenspektrometrie	22
2.4.1.3	Spezielle Massenspektrometrie von Sulfokonjugaten	24
2.4.2	Kernspinresonanzspektroskopie von Sulfokonjugaten	24
<b>2.5</b>	<b>Missbrauch von <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Sympathomimetika im Sport</b>	<b>25</b>

<b>2.6 <math>\alpha</math>- und <math>\beta</math>-Sympathomimetika in der Dopinganalytik</b>	<b>26</b>
<b><u>3 Experimenteller Teil</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b>3.1 Synthese und Charakterisierung von Referenzverbindungen</b>	<b>27</b>
3.1.1 Untersuchung verschiedener Sulfonierungsreagenzien in Reaktion mit Etilefrin	27
3.1.1.1 Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe	27
3.1.1.2 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat	28
3.1.2 Untersuchungen zu einer möglichen selektiven Synthese des phenolisch veresterten Etilefrin <i>mono</i> -Sulfokonjugates	28
3.1.2.1 Dimethyloxazolidin-Derivat	29
3.1.2.2 Veresterung mit Ameisensäure	30
3.1.2.3 Boc-Schutzgruppe mit angeschlossener Oxidation	31
3.1.2.4 Methylboronat-Derivat	32
3.1.3 Kontrollierte Sulfonierung von Etilefrin	32
3.1.4 Untersuchung der <i>in vitro</i> -Sulfonierung von Fenoterol	33
3.1.5 Referenzverbindungen	34
3.1.5.1 Synthese Octopamin-Sulfokonjugat	34
3.1.5.2 Synthese Terbutalin-Sulfokonjugat	35
3.1.5.3 <i>In vitro</i> -Synthese Fenoterol-Sulfokonjugat	35
3.1.5.4 Gewinnung von Salbutamol-Sulfokonjugat aus Urin	36
<b>3.2 Ausscheidungsstudien</b>	<b>36</b>
3.2.1 Octopamin	36
3.2.2 Terbutalin	38
3.2.3 Fenoterol	38
<b>3.3 Screeningprozedur</b>	<b>39</b>



3.3.1	Probenvorbereitung	39
3.3.2	Analytik	40
3.3.3	Qualitätskontrollproben	40
3.3.4	Validierung der Methode	40
3.3.4.1	Spezifität	40
3.3.4.2	Ionensuppression/ Ionenverstärkung	41
3.3.4.3	Präzision	41
3.3.4.4	Nachweisgrenze	41
3.3.4.5	Robustheit	41
3.3.5	Anwendung auf Urinproben	42
<b>3.4</b>	<b>Messmethodik</b>	<b>43</b>
3.4.1	LC-MS/MS System I	43
3.4.2	LC-MS/MS System II	44
3.4.3	LC-MS/MS System III	45
3.4.4	Präparatives LC-UV System	46
3.4.5	LTQ-Orbitrap <sup>TM</sup> -Hybridmassenspektrometer	47
3.4.6	LC-Quadrupol/ Orbitrap-Massenspektrometer	48
3.4.7	NMR-Charakterisierung	49
<b>4</b>	<b><u>Ergebnisse und Diskussion</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b>4.1</b>	<b>Synthese von Referenzverbindungen</b>	<b>51</b>
4.1.1	Untersuchung verschiedener Sulfonierungsreagenzien in Reaktion mit Etilefrin	51
4.1.1.1	Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe	58
4.1.1.2	2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat	60

4.1.2	Untersuchungen zu einer möglichen selektiven Synthese des phenolisch veresterten Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugates	61
4.1.2.1	Dimethyloxazolidin-Derivat	61
4.1.2.2	Veresterung mit Ameisensäure	64
4.1.2.3	Boc-Schutzgruppe mit angeschlossener Oxidation	66
4.1.2.4	Methylboronat-Derivat	71
4.1.3	Kontrollierte Sulfonierung von Etilefrin	73
4.1.4	Untersuchung der <i>in vitro</i> -Sulfonierung von Fenoterol	74
4.1.5	Referenzverbindungen	79
4.1.5.1	Octopamin-Sulfokonjugat	79
4.1.5.2	Terbutalin-Sulfokonjugat	79
4.1.5.3	Fenoterol-Sulfokonjugat	80
4.1.5.4	Salbutamol-Sulfokonjugat	82
4.1.6	Schlussfolgerung der Synthese von Referenzverbindungen	82
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der Referenzsubstanzen</b>	<b>85</b>
4.2.1	MS und HRMS	85
4.2.1.1	Octopamin-Sulfokonjugat	85
4.2.1.2	Terbutalin-Sulfokonjugat	87
4.2.1.3	Fenoterol-Sulfokonjugat	92
4.2.1.4	Salbutamol-Sulfokonjugat	99
4.2.2	NMR-Spektroskopie	101
4.2.2.1	Octopamin-Sulfokonjugat	101
4.2.2.2	Terbutalin-Sulfokonjugat	102
4.2.3	Schlussfolgerung der Charakterisierung der Referenzsubstanzen	102
<b>4.3</b>	<b>Ausscheidungsstudien</b>	<b>104</b>
4.3.1	Octopamin	104

4.3.2	Terbutalin	107
4.3.3	Fenoterol	111
4.3.4	Schlussfolgerung der Ausscheidungsstudien	113
<b>4.4</b>	<b>Screeningprozedur</b>	<b>115</b>
4.4.1	Probenvorbereitung	115
4.4.2	Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie	115
4.4.3	Validierung	117
4.4.4	Anwendung auf Urinproben	119
4.4.5	Schlussfolgerung der Screeningprozedur	120
<b><u>5</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Literatur</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Anhang</u></b>	<b><u>141</u></b>
7.1	Sulfokonjugatbildung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen	141
7.2	Massenspektren	144
7.3	NMR-Spektren	148
7.4	<i>in vitro</i> -Untersuchung Fenoterol Sulfokonjugate	150
7.5	Screeningprozedur	154
7.6	Materialien	165
7.6.1	Chemikalien und Reagenzien	165
7.6.2	Referenzverbindungen	167
7.6.3	Gewebe und Enzyme	167



## Allgemeine Abkürzungen

A	Adrenalin
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> , chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Boc-	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CE	<i>collision energy</i> , Kollisionsenergie
CID	<i>collision-induced dissociation</i>
COMT	Catechol-O-methyl-Transferase
cps	<i>counts per second</i>
CV	<i>coefficient of variation</i> , Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom P450
<i>d</i>	Dublett
Da	Dalton
DA	Dopamin
DCM	Dichlormethan
EPI	<i>enhanced product ion</i>
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Hydrochlorid
hIS9	humane Intestinum S9-Fraktion
hLeC	humanes Leber-Cytosol
hLeS9	humane Leber S9-Fraktion
hLuS9	humane Lungen S9-Fraktion
hNS9	humane Nieren S9-Fraktion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution accurate mass spectrometry</i> , hochauflösende/ akkurate Tandem-Massenspektrometrie
Hz	Hertz
i.v.	intravenös
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
ISTD	interner Standard
L	Liter
LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
L-DOPA	Levodopa
LIT	<i>linear ion trap</i> , lineare Ionenfalle
LOD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
M	mol/L
<i>m</i>	Multiplett
m	Meter
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MA	Methamphetamin
MAO	Monoaminoxidase
MeOH	Methanol
min	Minute
mol	Mol
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>

MRPL	<i>minimum required performance limit</i>
NA	Noradrenalin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
<i>p</i>	<i>para</i>
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
pNP	p-Nitrophenol
Ppi	Pyrophosphat
ppm	<i>parts per million</i>
QC	Qualitätskontrolle
RRT	relative Retentionszeit
RT	Retentionszeit
<i>s</i>	Singulett
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SPE	<i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
SULT	Sulfotransferase
<i>t</i>	Triplett
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## Substanz-Abkürzungen

<b>1</b>	Etilefrin
<b>1-Sulf1</b>	Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 1
<b>1-Sulf2</b>	Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 2
<b>1-Sulf3</b>	Etilefrin- <i>bis</i> -Sulfokonjugat
<b>2</b>	Octopamin
<b>2-Sulf</b>	Octopamin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>3</b>	Norfenefrin
<b>4</b>	<i>p</i> -Hydroxyamphetamin
<b>4-Sulf</b>	<i>p</i> -Hydroxyamphetamin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>5</b>	<i>p</i> -Hydroxymethamphetamin
<b>5-Sulf</b>	<i>p</i> -Hydroxymethamphetamin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>6</b>	Etamivan
<b>6-Sulf</b>	Etamivan- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>7</b>	Terbutalin
<b>7-Sulf1</b>	Terbutalin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 1
<b>7-Sulf2</b>	Terbutalin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 2
<b>7-Sulf3</b>	Terbutalin- <i>bis</i> -Sulfokonjugat 1
<b>7-Sulf4</b>	Terbutalin- <i>bis</i> -Sulfokonjugat 2
<b>7-Sulf5</b>	Terbutalin- <i>tris</i> -Sulfokonjugat
<b>8</b>	Bambuterol
<b>9</b>	Fenoterol
<b>9-Sulf1</b>	Fenoterol- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 1
<b>9-Sulf2</b>	Fenoterol- <i>mono</i> -Sulfokonjugat 2
<b>9-Sulf3</b>	Fenoterol- <i>bis</i> -Sulfokonjugat
<b>10</b>	Salbutamol
<b>10-Sulf</b>	Salbutamol- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>11</b>	Formoterol
<b>12</b>	Salmeterol
<b>13</b>	N-Isopropenyl-Etilefrin
<b>13-Sulf</b>	N-Isopropenyl-Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>14</b>	Etilefrin- <i>mono</i> -Formiat 1



<b>15</b>	Etilefrin- <i>mono</i> -Formiat 2
<b>16</b>	Etilefrin- <i>bis</i> -Formiat 1
<b>17</b>	Etilefrin- <i>bis</i> -Formiat 2
<b>18</b>	<i>mono</i> -Boc-Etilefrin
<b>18-Sulf1</b>	<i>mono</i> -Boc-Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat
<b>18-Sulf2</b>	<i>mono</i> -Boc-Etilefrin- <i>bis</i> -Sulfokonjugat
<b>19</b>	<i>bis</i> -Boc-Etilefrin



## 1 Einleitung

Aufgrund ihrer leistungssteigernden Eigenschaften verbietet die *World-Anti-Doping-Agency* (WADA) die Benutzung von Stimulanzien und  $\beta_2$ -Agonisten im Sport. Den Regularien zufolge sind  $\beta_2$ -Agonisten innerhalb des Wettkampfes und im Training verboten, Stimulanzien nur innerhalb des Wettkampfes.<sup>1</sup> Sympathomimetika, wie  $\beta_2$ -Agonisten, werden zu Dopingkontrollzwecken in der Regel nach chemischer Hydrolyse von Phase-II-Konjugaten mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert. Die Entwicklung analytischer Verfahren zum Nachweis von im Sport verbotenen Substanzen im Urin schreitet schnell voran und die Direktmessung von Urinproben ohne aufwendige Probenvorbereitung ist inzwischen aufgrund von Zeit- und Kostenersparnis weit verbreitet.<sup>2-4</sup> Zum Nachweis von verbotenen Substanzen mittels Direktmessung ist detailliertes Wissen zum Metabolismus der jeweiligen Substanzen notwendig. Insbesondere sind Informationen über den Phase-II-Metabolismus von Bedeutung, da eine Hydrolyse bei der Probenvorbereitung zur Direktmessung der Urinproben entfällt. Die häufigsten Phase-II-Konjugate stellen die Glucuronsäure- und Sulfokonjugate dar. Einige Sympathomimetika ( $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Agonisten: z.B. Etilefrin und Terbutalin) werden als Sulfokonjugate ausgeschieden.<sup>5</sup> Diese Substanzen standen im Fokus der hier durchgeführten Arbeit. Das Ausmaß der Konjugation ist oftmals unbekannt und eine detaillierte Charakterisierung der Metaboliten fehlt. Zur direkten Bestimmung und Charakterisierung der intakten Konjugate ist Referenzmaterial nötig. Aufgrund der Struktur der Sympathomimetika, die oftmals mehrere Hydroxygruppen besitzen, führt eine direkte Umsetzung der Edukte mit Sulfonierungsreagenzien zu verschiedenen Produkten, von denen in der Regel nur eines das Sulfokonjugat ist, das nach Applikation des Xenobiotikums ausgeschieden wird.

So sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Gibt es eine Möglichkeit, auf chemischem Weg selektiv Sulfokonjugate herzustellen?
  - Können Sulfonierungsreagenzien unter bestimmten Reaktionsbedingungen ein bestimmtes Sulfokonjugat bevorzugt bilden?

- Gibt es Synthesewege mit Hilfe von unterschiedlichen Schutzgruppen-Derivaten, bei denen gezielt ein bestimmtes Sulfokonjugat gebildet wird?
- Welche Bedingungen stellen die optimalen für eine Aufreinigung der Syntheseansätze dar?
- Hat die *in vitro*-Synthese das Potential, gezielte Sulfokonjugate zu produzieren? Katalysierende Enzyme der Reaktion sind cytosolische Sulfotransferasen, für Sympathomimetika besonders SULT1A1 und SULT1A3, die das Cosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat benötigen.<sup>6-8</sup>
- Welche Gewebepräparationen und rekombinanten Enzyme eignen sich am besten für die Sulfonierung von Sympathomimetika?
- Welche Reaktionsbedingungen stellen die optimalen dar, um die höchste Ausbeute für eine Charakterisierung der Metaboliten zu erhalten?
- Welche Struktur besitzen die Metaboliten und die Nebenprodukte der Synthese?
- Kann mit Ausscheidungsstudien belegt werden, dass und in welchem Ausmaß die Sulfokonjugate im Vergleich zur freien Muttersubstanz ausgeschieden werden?

Durch das Umgehen einer Hydrolyse und weiterer intensiver Probenvorbereitung der Ausscheidungsurine könnte eine kombinierte Analytik der Sulfokonjugate der Sympathomimetika mit Substanzen, die überwiegend unverändert ausgeschieden werden (z. B. Diuretika, Narkotika, bestimmte Stimulanzien und  $\beta_2$ -Agonisten), möglich sein.

- Können diese Substanzen trotz ihrer unterschiedlichen chemischen Eigenschaften in einer kombinierten Analytik zusammengefasst werden?

## 2 Literaturbesprechung

### 2.1 Pharmakologie

#### 2.1.1 Adrenorezeptoren und Catecholamine

Das vegetative Nervensystem besteht aus dem Parasympathikus, dem Sympathikus und dem Darmnervensystem. Das sympathische und parasympathische Nervensystem umfasst jeweils zwei Neuronen. Das erste Neuron leitet Erregung vom Zentralnervensystem (ZNS) zu einem vegetativen Ganglion, in dem die Umschaltung auf das zweite, zum Erfolgsorgan ziehende Neuron erfolgt. Sympathikus und Parasympathikus unterscheiden sich dabei in den Ursprüngen der präganglionären Neurone im ZNS, der Lage der vegetativen Ganglien, den Neurotransmittern und der Beeinflussung der Erfolgsorgane. Die Erregungsübertragung von den präganglionären auf die postganglionären Neurone erfolgt durch die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin aus Speichervesikeln in den synaptischen Spalt. Acetylcholin wirkt über nikotinische und muskarinische Rezeptoren. Die nikotinische Wirkung wird über ligandgesteuerte Ionenkanäle, die muskarinische Wirkung über G-Protein (Guaninnucleotid-bindendes Protein) gekoppelte Rezeptoren gesteuert. An den postganglionären Neuronen erfolgt die Erregungsübertragung durch Noradrenalin (NA) auf die Rezeptoren am Erfolgsorgan.<sup>9</sup>

$\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, mit einer Molekülmasse von 64 kDa. Die Rezeptoren besitzen sieben transmembranäre Helices, mit zwei N-verknüpften Oligosaccharideinheiten auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran (siehe Abbildung 1). Eine Schleife auf der zytosolischen Seite ist an der Aktivierung von  $G_s$ , dem stimulierenden G-Protein, beteiligt. Die Phosphorylierung mehrerer Serin- und Threoninreste im intrazellulär gelegenen carboxyterminalen Ende verhindert, dass der Rezeptor mit dem G-Protein in Wechselwirkung tritt.<sup>10-12</sup>

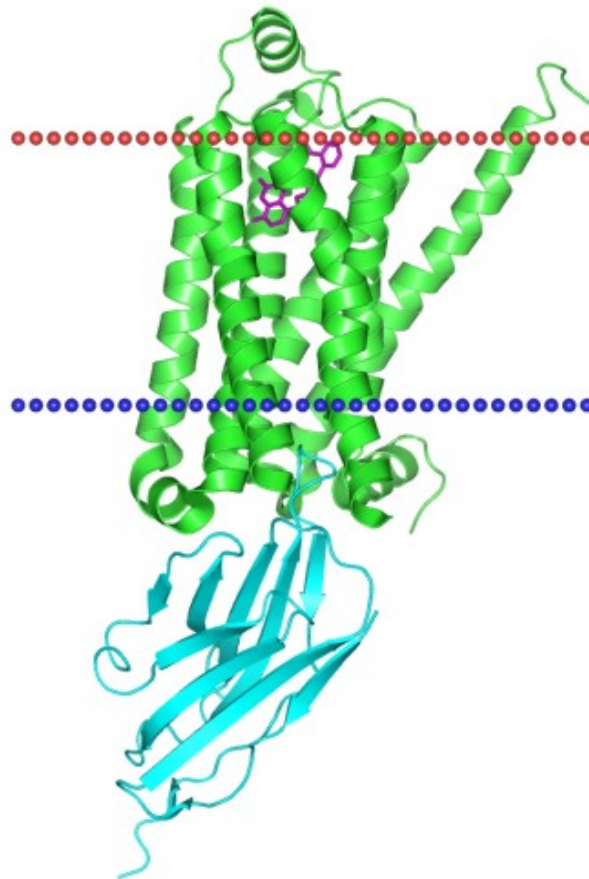


Abbildung 1 Röntgenkristallstruktur des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (grün; Nanobody-stabilisiert, türkis) mit dem Agonisten BI-167107 (magenta); Protein Data Bank ID: 3P0G<sup>13</sup>

Wenn ein Agonist (z. B. NA) extrazellulär an einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (z. B.  $\beta_2$ -Adrenorezeptor) bindet, führt dies zu einer Konformationsänderung des zytoplasmatischen Teils des transmembranären Segments (siehe Abbildung 2). Dies bewirkt, dass das  $G_s$ -Heterotrimer (bestehend aus  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheit) am Rezeptor binden kann und das gebundene Guanosindiphosphat (GDP) aus der  $\alpha$ -Untereinheit freigesetzt wird. Daraufhin kann Guanosintriphosphat (GTP) an der nun Nukleotid-freien  $\alpha$ -Untereinheit binden, was zur Dissoziation der  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten vom Rezeptor führt. Die Untereinheiten regulieren daraufhin ihre jeweiligen Effektorproteine. Im Falle des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors sind dies Adenylatcyclasen und  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Das  $G_s$ -Heterotrimer fügt sich wieder zusammen, wenn GTP zu GDP in der  $\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert wurde.<sup>14</sup>

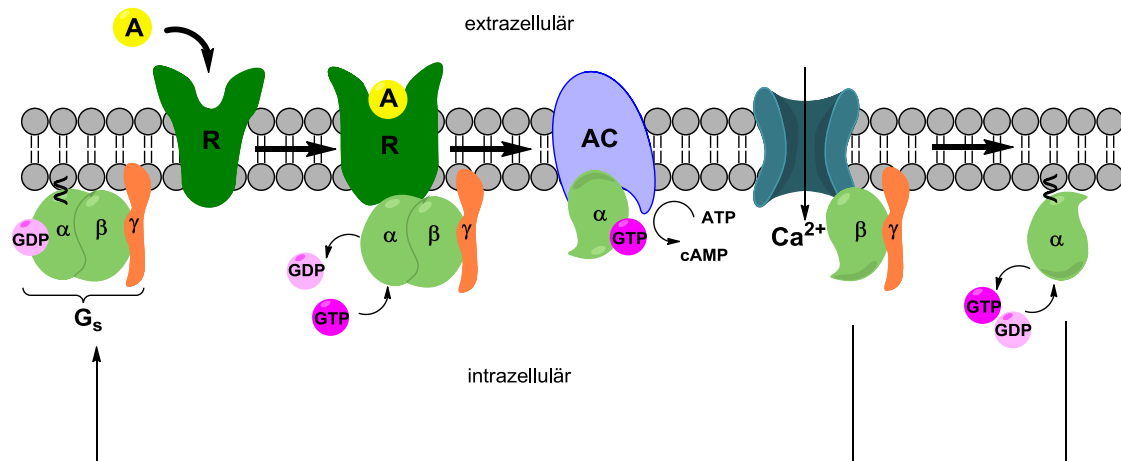


Abbildung 2 G-Protein Zyklus eines  $\beta_2$ -Adrenorezeptor-G-Protein-Komplexes (A = Agonist, R = Rezeptor, AC = Adenylatcyclase)<sup>14</sup>

Als Überträgersubstanz der meisten sympathischen postganglionären Nervenendigungen wirkt NA an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptoren. NA gehört neben Adrenalin (A) und Dopamin zu den Catecholaminen. NA wird über Levodopa (L-DOPA) und Dopamin aus L-Tyrosin gebildet. A kann aus NA durch Methylierung in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks gebildet werden (Abbildung 3).<sup>15,16</sup>

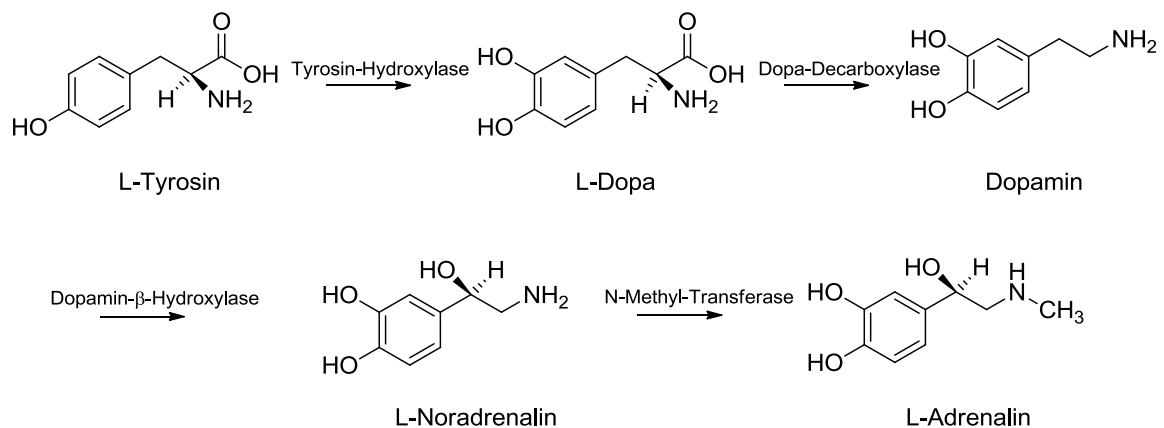


Abbildung 3 Biosynthese von Noradrenalin und Adrenalin<sup>16</sup>

Das in Vesikeln gespeicherte NA wird bei einer Depolarisation durch Exozytose in den synaptischen Spalt abgegeben. Einerseits löst dies eine Aktivierung postsynaptischer Rezeptoren im Erfolgsorgan und damit die Zielwirkung aus, zum anderen erregt NA die präsynaptischen Rezeptoren und beeinflusst durch einen Feedback-Mechanismus die Neurotransmitterfreisetzung. Die Hauptmenge wird bereits vor Erreichen der Rezeptoren von der Präsynapse wieder aufgenommen. In der Zelle wird NA über die

Monoaminoxidase (MAO) und/oder Catechol-O-methyl-Transferase (COMT) enzymatisch abgebaut. MAO oxidiert Monoamine zu den entsprechenden Aldehyden, welche anschließend mittels Aldehyddehydrogenase zu Carbonsäure-Analoga metabolisiert werden. COMT methyliert eine der Phenolfunktionen des Catechols, was zu einem Methoxyderivat führt.<sup>9,17</sup>

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren sind die beiden Hauptgruppen der Adrenorezeptoren und können nochmals in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - sowie in  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -Rezeptoren unterteilt werden. Die unterschiedlichen Wirkungen von NA lassen sich auf seine jeweilige spezifische Affinität an den verschiedenen Adrenorezeptorsubtypen zurückführen. Zusätzlich ist es von Bedeutung, dass durch eine Stimulation der verschiedenen Rezeptorsubtypen unterschiedliche Folgeaktionen ausgelöst werden:

- Die Stimulation von  $\alpha_1$ -Rezeptoren bewirkt die Aktivierung der Phospholipase C, wodurch Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol gebildet werden.  $IP_3$  setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum  $Ca^{2+}$ -Ionen frei. Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C und führt dadurch zur Phosphorylierung verschiedener Zielproteine.
- Die Aktivierung von  $\alpha_2$ -Rezeptoren löst vor allem die Hemmung der Adenylatcyclase und dadurch eine verringerte Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus.
- Die Erregung von  $\beta$ -Rezeptoren bewirkt eine Aktivierung der Adenylatcyclase und damit die vermehrte Bildung von cAMP, welches als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) folgende Reaktionen hervorruft: Am Herzen kommt es infolge von Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren zu einer Phosphorylierung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle und es kommt zur Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Außerdem nimmt die  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum zu und der  $Ca^{2+}$ -Efflux ab.
- An der glatten Muskulatur hingegen wird über  $\beta_2$ -Rezeptoren durch Steigerung des Auswärtstransports und verstärkte Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum die Konzentration an freien  $Ca^{2+}$ -Ionen herabgesetzt.

Die durch NA und A vermittelten Wirkung ist eine allgemeine Vasokonstriktion, welche die Erhöhung des systolischen und diastolischen Blutdrucks zu Folge hat. Des Weiteren



bewirken NA und A eine Erschlaffung der glatten Muskulatur des Darms und der Bronchien, was eine verringerte Magen-Darm-Peristaltik und einen verminderten Strömungswiderstand der Bronchien zur Folge hat. In den Glucose- und Fettstoffwechsel greifen diese Catecholamine dadurch ein, dass über das aktivierte cAMP die Bildung einer aktiven Leber- und Muskelphosphorylase ausgelöst wird. Dadurch ist der Abbau von Glykogen katalysiert und der Blutzuckerspiegel steigt. Die lipolytische Wirkung wird vorwiegend durch  $\beta_3$ -Rezeptoren vermittelt. Dabei bewirkt cAMP eine Aktivierung einer Lipase, wodurch die Bildung freier Fettsäuren zunimmt.

Wirkstoffe die ähnlich wie NA und A wirken, werden als Sympathomimetika bezeichnet, die sich wiederum in direkte und indirekte Sympathomimetika unterscheiden lassen. Direkte Sympathomimetika treten selbst mit dem Rezeptor in Wechselwirkung (z. B. Salbutamol), indirekte Sympathomimetika (z. B. Ephedrin) fördern die präsynaptische Freisetzung des endogenen Transmitters oder hemmen deren Wiederaufnahme in das Axon.<sup>9</sup>

$\alpha$ -Sympathomimetika werden zur systemischen oder lokalen Vasokonstriktion eingesetzt. Die systemisch angewendeten Phenylethanolamin-Derivate werden zur Behandlung von hypotonen Blutdruckstörungen genutzt. Da NA und A bei oraler Applikation unwirksam und bei parenteraler Gabe nur kurz wirksam sind, wurde nach synthetischen Abwandlungsprodukten gesucht. Ein Beispiel dafür ist Norfenefrin, welches sich von NA durch das Fehlen einer phenolischen Gruppe unterscheidet. Phenylephrin ist ein  $\alpha$ -Agonist, der zur lokalen Anwendung bestimmt ist und nasal appliziert zur Schleimhautabschwellung benutzt wird.

Durch Veränderung der Substituenten an der Aminfunktion ist es gelungen Sympathomimetika zu entwickeln, die vor allem  $\beta_2$ -Rezeptoren stimulieren. Dadurch ist die kardiale Wirkung wesentlich verringert.  $\beta_2$ -Sympathomimetika können durch die Erschlaffung der Bronchialmuskulatur einen Bronchospasmus aufheben und bewirken durch die Anregung der Flimmerbewegung der Zilien eine Steigerung des Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien (mukoziliärer Apparat). Kurzwirksame inhalative  $\beta_2$ -Agonisten (z. B. Salbutamol) dienen der bedarfsorientierten Behandlung einer akuten Bronchialobstruktion. Substanzen mit längerer Wirkdauer (z. B. Salmeterol) werden bei einer systemischen Dauertherapie verwendet. Eine Erschlaffung der glatten

Muskulatur des Uterus wird ebenfalls durch  $\beta_2$ -Sympathomimetika hervorgerufen und ermöglicht somit bei oraler oder parenteraler Applikation den Einsatz als Tokolytikum (z. B. Fenoterol).

Daneben gibt es Substanzen die unselektiv an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptoren wirken. Dazu gehören die N-substituierten NA-Derivate Etilefrin und Oxilofrin, die auch bei oraler Applikation anhaltend blutdrucksteigernd wirken. Diese Wirkung ist zum einen durch die  $\alpha_1$ -Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion bedingt, zum anderen ist der  $\beta$ -adrenerge Effekt durch die positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen daran beteiligt.<sup>5</sup>

### 2.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Etilefrin (**1**) und Octopamin (**2**) (Strukturen siehe Abbildung 4) besitzen im Vergleich zu NA und A nur eine Hydroxygruppe am Phenylring. Sie sind lipophiler als die physiologischen Agonisten und deshalb bei oraler Applikation wirksam. Wie bei NA und A stellt das R-Stereoisomer das Eutomer dar. Octopamin ist ein NA- und A-Analogon, dem im Vergleich die *meta*-ständige Phenolgruppe der Muttersubstanz fehlt. Etilefrin stimuliert sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Rezeptoren und ist ein Beispiel dafür, dass die Vergrößerung des N-Alkyl-Substituenten zu einem Verlust der  $\alpha$ -Selektivität und einer Zunahme der  $\beta$ -stimulierenden Wirkung führt.

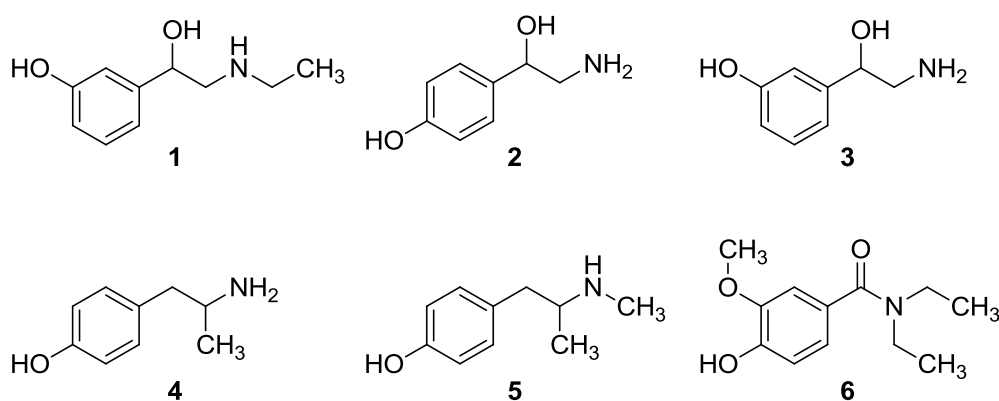


Abbildung 4 Strukturen der Stimulanzien Etilefrin (**1**), Octopamin (**2**), Norfenefrin (**3**), *p*-Hydroxyamphetamin (**4**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5**) und Etamivan (**6**)

Terbutalin (**7**), Bambuterol (**8**), Fenoterol (**9**), Salbutamol (**10**), Formoterol (**11**) und Salmeterol (**12**) (Strukturen siehe Abbildung 5) besitzen vorwiegend  $\beta_2$ -Aktivität. Die

Steigerung der relativen  $\beta_2$ -Selektivität wird vor allem durch raumerfüllende Reste an der Amin-Gruppe erreicht. Besonders ausgeprägt ist diese  $\beta_2$ -Selektivität beim Übergang vom Isopropyl- zum *tert*-Butyl-Rest. Der Austausch der Brenzcatechin-Struktur gegen eine isomere Resorcin-Struktur (**7**, **8**, **9**) führt zu einer Verlängerung der Wirkdauer, da eine Metabolisierung durch COMT nicht mehr möglich ist. Bambuterol ist ein lipophiles *Prodrug*, das durch Hydrolyse der Carbaminsäureester in Terbutalin überführt wird. Salbutamol und Salmeterol besitzen am Phenylring in Position 3 anstelle einer Hydroxygruppe eine Hydroxymethylgruppe. Salmeterol enthält einen langkettigen Phenylalkoxyalkyl-Rest am Stickstoff, der dem Arzneistoff eine hohe Lipophilie verleiht. Die Struktur von Formoterol weist anstelle einer Hydroxygruppe eine N-Formylgruppe auf. Alle selektiven  $\beta_2$ -Sympathomimetika werden therapeutisch als Racemate eingesetzt.<sup>16</sup>

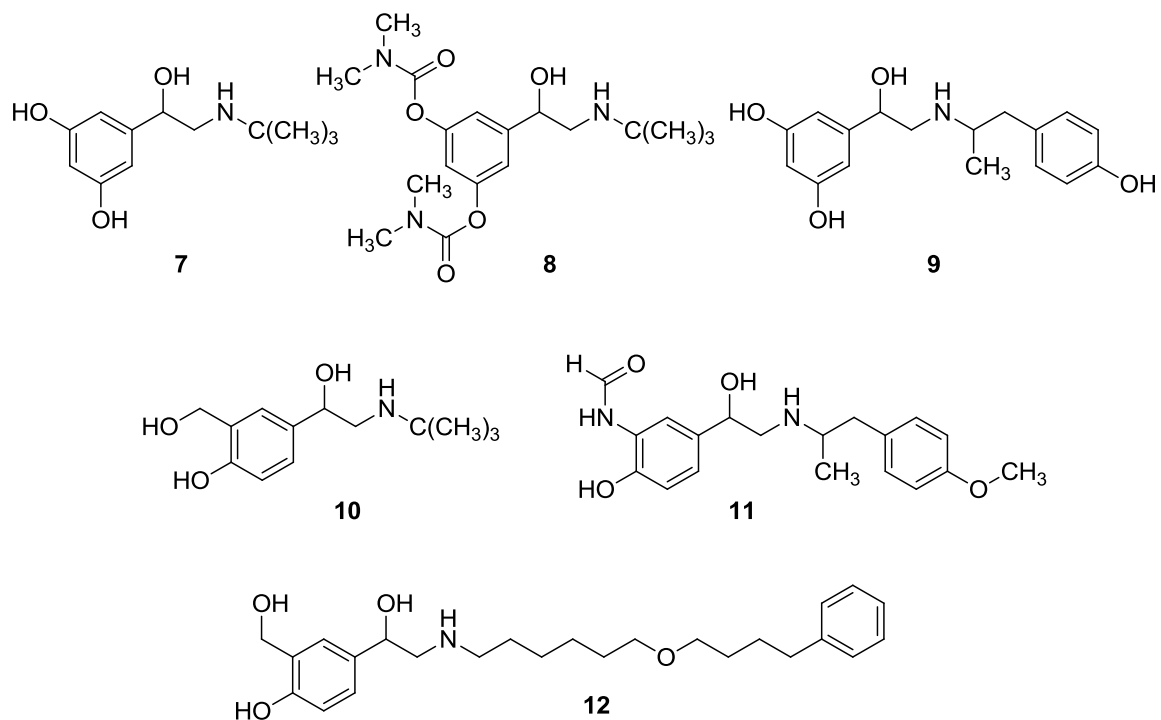


Abbildung 5 Strukturen der  $\beta_2$ -Sympathomimetika Terbutalin (**7**), Bambuterol (**8**), Fenoterol (**9**), Salbutamol (**10**), Formoterol (**11**) und Salmeterol (**12**)

### 2.1.3 Metabolismus von Sympathomimetika

Im Gegensatz zu den endogenen Sympathomimetika NA und A (Struktur siehe Abbildung 3) können MAO und COMT an den strukturveränderten, exogenen Sympathomimetika in der Regel nicht angreifen. Mit Ausnahme der oxidativen Desaminierung und einer Hydroxylierung findet ein Phase-I-Metabolismus nur in einem geringeren Ausmaß statt. Der Phase-II-Metabolismus der Hydroxyderivate durch Konjugation mit aktiviertem Sulfat oder Glucuronsäure führt zu verbessert wasserlöslichen Derivaten, die renal eliminiert werden können.

#### 2.1.3.1 Etilefrin

Nach oraler Gabe von Etilefrin (**1**, Abbildung 4) wird dieses schnell resorbiert. Die maximale Plasmakonzentration wird innerhalb von 0,75 h erreicht.<sup>18</sup> Die Eliminations-Halbwertszeit beträgt 2,2 h.<sup>19</sup> Die Bioverfügbarkeit ist nach oraler Zufuhr wegen des Ethylsubstituenten am Stickstoff höher als bei Stoffen die dort keinen Substituenten tragen. Dies begründet sich darin, dass Etilefrin wegen des Ethylsubstituenten von der hepatischen MAO nur noch schlecht abgebaut werden kann.<sup>20</sup> Hengstmann *et al.* stellten fest, dass die Hauptmetaboliten von Etilefrin das Sulfokonjugat und das Glucuronsäurekonjugat sind. Nur ein geringer Anteil wird zur korrespondierenden Hydroxymandelsäure desaminiert. Grund hierfür ist zum einen die geringe Affinität von N-alkylierten Phenylalkylaminen zu MAO. Zum anderen werden *meta*-hydroxylierte Phenylalkylamine bevorzugt konjugiert. Nach oraler Zufuhr von Etilefrin kommt es im Vergleich zur intravenösen Zufuhr zu einem Anstieg der Konjugat-Metaboliten.<sup>21</sup>

#### 2.1.3.2 Octopamin

Nach oraler Gabe von radioaktiv markiertem Octopamin (**2**, Abbildung 4) wurden 93 % der gegebenen Dosis innerhalb von 24 h ausgeschieden. Als Metaboliten werden die Produkte einer Desaminierung und Konjugation der unveränderten Substanz beschrieben. Die oxidative Desaminierung zu *p*-Hydroxymandelsäure durch MAO wird als Hauptweg beschrieben. Dieser Metabolit stellt zwei Drittel der totalen urinären Ausscheidung dar. Die Position und die Art der Konjugation (Glucuronid oder Sulfokonjugation) wurde nicht beschrieben, da die radioimmunologische Untersuchung nach enzymatischer oder chemischer Hydrolyse erfolgte.<sup>22</sup> Es wird diskutiert, ob

Octopamin endogen aus Tyramin entstehen kann und dann schnell weiter metabolisiert wird.<sup>23</sup> Allerdings konnte nach der Aufnahme von Nahrungsmitteln mit hohem Tyramin-Gehalt kein Octopamin in Urinproben nachgewiesen werden.<sup>24</sup>

### 2.1.3.3 Terbutalin

Nach oraler Gabe von Terbutalin (**7**, Abbildung 5) werden ein bis zwei Drittel der Dosis mit dem Urin ausgeschieden, während nach intravenöser und subkutaner Anwendung mehr als 90 % über diesen Weg ausgeschieden werden. Dies weist auf einen hohen präsystemischen Metabolismus (*First-pass-Effekt*) hin, der in diesem Fall bevorzugt in der Darmwand stattfindet.<sup>25</sup> Neben dem unveränderten Terbutalin konnte ein Sulfokonjugat als Hauptmetabolit im Urin nachgewiesen werden.<sup>26-29</sup> Ein Glucuronsäurekonjugat konnte in kleinerer Menge nachgewiesen werden.<sup>30</sup> Bezüglich der Position der Konjugation wurden bisher keine Untersuchungen veröffentlicht. Die Sulfonierung von racemischem Terbutalin durch humanes Leber-Cytosol findet stereoselektiv statt. So wird das (S)-(+)-Enantiomer, welches das Distomer ohne physiologische Aktivität ist, gegenüber dem (R)-(-)-Enantiomer, welches das Eutomer ist, bevorzugt metabolisiert.<sup>31</sup> Außerdem ist die orale Bioverfügbarkeit von Terbutalin ebenfalls stereoselektiv. Das (R)-(-)-Enantiomer hat eine doppelt so hohe Bioverfügbarkeit wie das (S)-(+)-Enantiomer. Dies wird zum einen auf eine unvollständige Absorption des (S)-(+)-Enantiomers und zum anderen auf den höheren präsystemischen Metabolismus zurückgeführt.<sup>32</sup>

### 2.1.3.4 Bambuterol

Bambuterol (**8**, Abbildung 5), das *bis*-N,N-Dimethylcarbamat-Derivat von Terbutalin, ist selber inaktiv an adrenergen Rezeptoren und wird vorwiegend durch Plasmacholinesterasen zu Terbutalin umgewandelt.<sup>33-35</sup> Eine Beteiligung von Cytochrom P450 (CYP)-Enzymen wird ebenfalls vermutet. Der Stoffwechselweg umfasst verschiedene Intermediate, von denen mit Ausnahme von Terbutalin keiner pharmakologisch aktiv ist. Nach oraler Aufnahme von radioaktiv markiertem Bambuterol wurden 14,1 % der Dosis im Urin nachgewiesen. Die Hauptmetaboliten von Bambuterol (Wiederfindung der unveränderten Substanz im Urin: 6,0 %) sind Terbutalin (35,7 %), ein Monocarbat (10,2 %) und sein hydroxyliertes Derivat (hydroxylierte Methylgruppe

des Carbamates; 16,3 %).<sup>36</sup> Studien über die Ausscheidung von konjugiertem Terbutalin oder einem anderen konjugierten Bambuterolkonjugat nach Einnahme von Bambuterol wurden bisher nicht durchgeführt.

### 2.1.3.5 Fenoterol

Nach oraler Aufnahme von Fenoterol (**9**, Abbildung 5), werden 39 % der Dosis innerhalb von 48 h renal eliminiert, während 40 % der Dosis innerhalb von 60 h mit den Faeces ausgeschieden werden.<sup>37</sup> Metabolismusstudien zeigten neben der unverändert ausgeschiedenen Substanz ein Sulfokonjugat als Hauptmetaboliten. Des Weiteren konnte durch indirekte Analyse nach enzymatischer oder chemischer Hydrolyse ein Glucuronsäurekonjugat in geringem Ausmaß im Urin nachgewiesen werden.<sup>38-40</sup> Der Stoffwechselweg hängt stark von der Art der Applikationsform ab.<sup>41</sup> Zwei Drittel einer intravenösen (i.v.) Dosis konnten im Urin als Konjugate nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Konjugaten zu unverändertem Fenoterol steigt bei oraler Applikation wegen eines starken *First-pass*-Effektes an. Nur 2 % einer oralen Dosis erreichen die systemische Zirkulation als intakte Substanz.<sup>42</sup> Nach Infusion von Fenoterol ist der zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentration beider Konjugate und der des Aglykons fast gleich. Nach oraler Gabe übersteigt die Plasmakonzentration der Konjugate die des Aglykons. Nach einer Dosis von drei Mal 10 mg Fenoterol alle 20 Minuten ist das Verhältnis zwischen glucuronidiertem und sulfokonjugiertem Fenoterol im Plasma 1:6. In dieser Studie war das Verhältnis zwischen Sulfokonjugaten und Aglykon auf 117:1 bestimmt. Das Verhältnis zwischen Glucuronid und Aglykon betrug 20:1.<sup>38</sup> Nach inhalativer Verabreichung von Tritium-markiertem Fenoterol konnten Laros *et al.* die Ausscheidung der gesamten Radioaktivität messen. Die kumulative renale Exkretion nach 24 h betrug 12,1 %.<sup>41</sup> Der intensive *First-pass*-Effekt nach oraler Gabe ist nicht nur auf einen starken Metabolismus in der Leber zurückzuführen, sondern auch ein ausgeprägter präsystemischer Metabolismus im Darm oder der Darmwand liegt dem zugrunde.<sup>43</sup> Eine weitere Studie untersuchte die stereoselektive Sulfonierung durch zwei unterschiedliche humane Phenolsulfotransferasen. Dabei wurden zwei verschiedene Sulfokonjugate detektiert und erste Strukturbestimmungen mittels Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass SULT1A3 selektiv die Sulfonierung des (*R,R*)-Enantiomers (Eutomer) an

der 4''-Hydroxyphenyl-Position katalysiert, während die Sulfonierung der 3', 5'-bis-hydroxyphenyl-Position leicht selektiv für das (S,S)-Enantiomer (Distomer) war. Die SULT1A1 katalysiert selektiv die Sulfonierung des (S,S)-Enantiomers.<sup>44</sup>

#### 2.1.3.6 Salbutamol

Nach oraler Applikation von radioaktiv markiertem Salbutamol wurden 70 % der gegebenen Dosis im Urin gefunden. Salbutamol (**10**, Abbildung 5) wird nach der Absorption in hohem Maß in der Darmwand metabolisiert.<sup>45</sup> Beim Menschen kann nach Aufnahme von Salbutamol, unverändertes Salbutamol und das Salbutamol-Sulfokonjugat im Urin nachgewiesen werden. Die orale Applikation ergibt eine höhere Salbutamol-Konzentration als die inhalative Applikation.<sup>46,47</sup> Das Sulfokonjugat konnte als 4-O-Sulfatester identifiziert werden.<sup>47-49</sup> Das Verhältnis von Konjugat und Aglykon verbleibt über den gesamten Ausscheidungszeitraum annähernd konstant bei 4:1.<sup>50</sup> In früheren Ausscheidungsstudien mit Salbutamol konnte kein Glucuronsäurekonjugat nachgewiesen werden. Eine ausführliche Untersuchung zur Ausscheidung von Salbutamol und seinem Glucuronsäurekonjugat wurde von Mareck *et al.* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Urinproben mit hoher Salbutamol-Konzentration auch das entsprechende Glucuronsäurekonjugat enthalten.<sup>46</sup>

#### 2.1.4 Sulfonierung als Entgiftung

Bei Menschen und einigen Säugetieren ist die durch Sulfotransferasen (SULTs) katalysierte Sulfonierung in die Biotransformation und Exkretion von Xeno- und Endobiotika, wie Medikamenten, chemischen Karzinogenen, Hormonen, Gallensäuren, Neurotransmittern, Peptiden und Lipiden, involviert. Die Sulfonierung ist in der Natur weit verbreitet und kommt in Organismen von der Mikrobe bis zum Menschen vor.<sup>51</sup> In den meisten Fällen ist die Sulfonierung eine Entgiftungsreaktion, die zu wasserlöslicheren Produkten führt, die verbessert über die Niere oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden können, wie das für Paracetamol oder den Neurotransmitter Dopamin der Fall ist. Bei anderen Xenobiotika wie N-Hydroxy-arylamine und hydroxymethylierte polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe ist die Sulfonierung ein metabolischer Aktivierungsprozess, der zu hochreaktiven Elektrophilen führt, die mutagen und karzinogen sind. Bei der das Haarwachstum fördernden Substanz

Minoxidil und dem Peptidhormon Cholecystokinin (CCK) bewirkt die Sulfonierung eine Aktivierung der Substanz.<sup>6,52</sup>

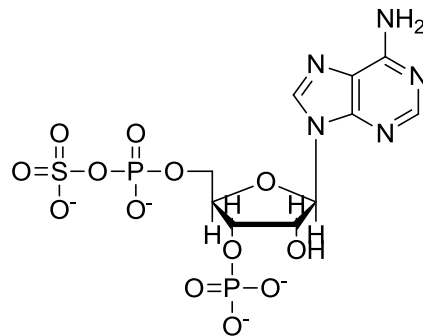


Abbildung 6 Struktur von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)

SULTs katalysieren den Transfer einer Sulfonatgruppe ( $\text{SO}_3^-$ ) von einem aktiven Sulfat, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS; Struktur siehe Abbildung 6), an einen Akzeptor, welcher entweder eine Hydroxy- oder eine Aminofunktion besitzt (Abbildung 7).<sup>53</sup> PAPS wird in einer Zweistufenreaktion (Abbildung 8) aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und anorganischem Sulfat gebildet. Im ersten Schritt reagiert anorganisches Sulfat mit ATP zu Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ). Dieser Schritt ist durch das cytosolische Enzym ATP-Sulfurylase katalysiert und resultiert in der Bildung einer energiereichen Phosphor-Schwefel-Anhydrid Bindung, welche die chemische Basis für die Sulfat-Aktivierung ist. In Richtung der Bildung von APS hat das Enzym eine ungünstige Gleichgewichtskonstante; die Reaktion ist in die physiologische Richtung durch die Hydrolyse von  $\text{PP}_i$  zu zwei Molekülen Orthophosphat durch die ubiquitäre anorganische Pyrophosphatase angetrieben. Der zweite Schritt wird durch die APS-Kinase katalysiert und beinhaltet die Reaktion von APS mit ATP zu PAPS und Adenosin-5'-diphosphat (ADP).<sup>8,52-55</sup>

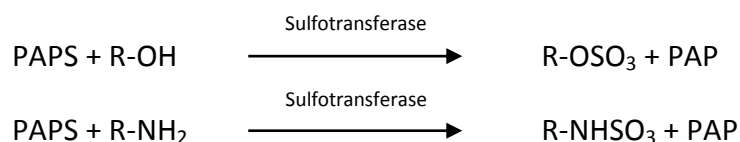


Abbildung 7 Umsetzung von PAPS mit Hydroxy- und Aminderivaten katalysiert durch Sulfotransferasen



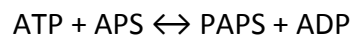
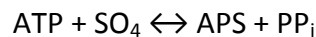


Abbildung 8 Bildung von PAPS durch ATP und Sulfat katalysiert durch ATP-Sulfurylasen und APS-Kinasen

Im Menschen sind drei SULT-Familien (SULT1, SULT2, SULT4) mit insgesamt 13 Mitgliedern identifiziert worden. SULTs sind in vielen Geweben verbreitet und sind eines der Hauptentgiftungsenzymsysteme. Es gibt zwei Hauptklassen von SULTs, die Membran-gebundenen SULTs, die im Golgi-Apparat der Zelle lokalisiert sind und für die Sulfonierung von Peptiden (z. B. CCK), Lipiden und Glykosaminoglykanen verantwortlich sind und die cytosolischen SULTs, die für den Metabolismus von Xenobiotika und niedermolekularen endogenen Substanzen (z. B. Steroide, Gallensäuren, Neurotransmitter) verantwortlich sind. Die breite Substratspezifität der SULTs ist darauf zurückzuführen, dass zahlreiche Formen der Enzyme existieren und dass die Bindungsstelle einiger Isoformen flexibel ist. So ist es möglich, dass ein Enzym verschiedene Strukturen annimmt. Auf diese Art und Weise kann ein Enzym sowohl mit niedermolekularen Aromaten als auch mit ringverknüpften Substanzen interagieren.<sup>6,56</sup>

Im Besonderen soll an dieser Stelle auf die cytosolische SULT1 Familie eingegangen werden. Die Gensequenzen der Enzyme SULT1A1 und SULT1A2 sind zu 93 % homolog, während SULT1A3 nur ca. 60 % Homologie zu den anderen beiden Genen aufweist. SULT1A1 ist das vorherrschende SULT1A Protein in der menschlichen Leber.<sup>6</sup> Diese Form wurde ursprünglich thermostabile oder Phenol-Sulfotransferase benannt,<sup>57</sup> während SULT1A3 als thermolabile oder Monoamin-Sulfotransferase bezeichnet wurde.<sup>58</sup> Diese beiden Enzyme sind verantwortlich für den Metabolismus der meisten phenolischen Verbindungen. SULT1A3 wurde bisher nur bei Menschen vorgefunden und erfüllt hier mit der Sulfonierung von Catecholaminen eine spezifische Rolle.<sup>59,60</sup>

Die Mitglieder der SULT1A Familie haben die breiteste Gewebeverteilung unter den cytosolischen SULT Subfamilien. SULT1A1 wurde in der Leber, sowie in Gehirn, Brustgewebe, Endometrium, Nebenniere, Thrombozyten, Plazenta, Niere, Lunge und Jejunum nachgewiesen. SULT1A3 ist nur in geringer Menge in der Leber nachzuweisen,

wird aber in großer Menge in Jejunum und Intestinum exprimiert. Daneben findet man SULT1A3 ebenfalls in Blutplättchen, Plazenta, Lunge und Gehirn. Da beide Enzyme in Intestinum und Lunge nachgewiesen wurden und Xenobiotika über diese Organe überwiegend in den Organismus gelangen, liegt nahe, dass die Enzyme eine bedeutende Rolle bei der extrahepatischen Entgiftung und metabolischen Aktivierung dieser Substanzen spielen.<sup>6</sup>

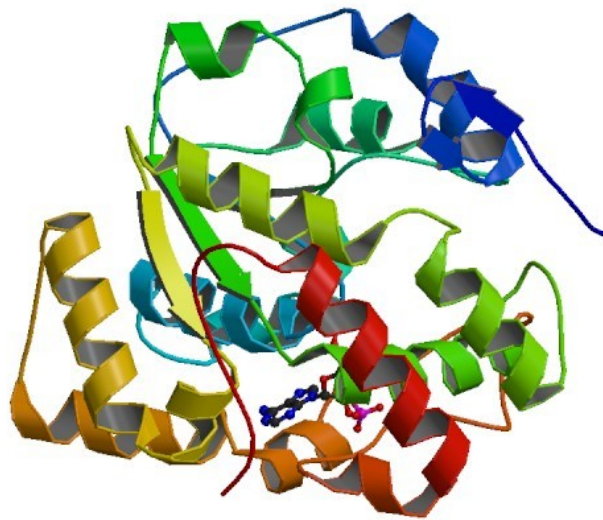


Abbildung 9 Struktur von SULT1A1 mit 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP; blau/magenta), Protein Data Bank ID: 4GRA<sup>61</sup>

Die SULT Kristallstruktur (SULT1A1, siehe Abbildung 9) zeigt, dass es sich bei diesem Protein um ein globuläres Protein mit einer einzelnen  $\alpha/\beta$  Domäne handelt, die eine charakteristische fünfsträngige, parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweist, die auf beiden Seiten eine  $\alpha$ -Helix besitzt. Die  $\beta$ -Faltblattstruktur birgt die PAPS-Bindungsstelle und die hauptkatalytischen Reste.<sup>62</sup> Im Gegensatz zur PAPS Bindungsstelle, die durch konservierte Reste bei allen SULTs charakterisiert ist, weist die Substratbindungstasche einen hohen Grad an Variabilität auf. Obwohl die humanen SULT1A1 und 1A3 zu 90 % die gleiche Sequenz aufweisen, zeigen diese auch eine deutlich unterschiedliche Substratspezifität. SULT1A1 bevorzugt ungeladene, einfache phenolische Verbindungen, wie *para*-Nitrophenol (*p*NP), während SULT1A3 positiv geladene Substanzen, wie Dopamin oder Tyramin präferiert.<sup>63</sup> Die Kristallstruktur von SULT1A1 weist die oben

genannte hydrophobe Substratbindungstasche auf, die die Bindung von ungeladenen Verbindungen klar bevorzugt. Dahingegen beinhaltet die Substratbindungsstelle von SULT1A3 saure Reste (z. B. Glu146 und Glu89), welche die Bindung von positiv geladenen Verbindungen begünstigen. Dabei wurde Glu146 als entscheidender Rest für die Bindung von Dopamin identifiziert.<sup>64</sup> Der Sulfuryl-Transfer-Mechanismus wurde für die Sulfonierung von *p*NP durch Arylsulfotransferase IV bei Ratten beschrieben. Dabei erfolgt ein zufälliger sequentieller bi-bi-Mechanismus bei welchem PAPS und *p*NP unabhängig voneinander am Enzym binden.<sup>65</sup> Gegensätzlich dazu beschreiben Studien mit humaner zerebraler Sulfotransferase die Sulfonierung als einen geordnet-sequentiellen bi-bi-Mechanismus.<sup>66</sup> Der Unterschied besteht darin, dass beim geordnet-sequentiellen Mechanismus, die Bindung des ersten Substrats notwendig ist, damit das Enzym die Bindungsstelle für das zweite Substrat ausbilden kann. Beim zufällig-sequentiellen Mechanismus können alle Substrate und Produkte in beliebiger Folge assoziieren und dissoziieren. Beide postulierten Mechanismen stimmen aber darin überein, dass der Sulfuryl-Transfer ohne eine Bildung von Intermediaten stattfindet.

Eine Substratinhibition wird bei hohen Konzentrationen des Substrates beobachtet und ist charakteristisch für SULTs.<sup>58</sup> Dennoch wird in mehrere Studien das Michaelis-Menten-Modell zur Analyse der Kinetik dieser Enzyme angenommen, dabei aber geringe Substratkonzentrationen unterhalb der des Substrat-inhibitorischen Bereichs benutzt.<sup>63,67</sup> Gamage *et al.*<sup>56</sup> konnten durch die Darstellung der Kristallstruktur von SULT1A1 erste Hinweise zur molekularen Basis der Substratinhibition mit kleinen planaren Substraten wie *p*NP geben. Die SULT1A1:PAP:*p*NP Struktur zeigt, dass zwei *p*NP Moleküle an der L-förmigen aktiven Seite gebunden sind. Dabei zeigte sich ein leicht positives Zusammenwirken bei niedrigen Substratkonzentrationen und Substratinhibition bei höheren Konzentrationen von *p*NP (über 2  $\mu$ M). Zunächst bindet das Enzym (E) an Bindungsstelle 1 und ergibt ES<sub>1</sub> (Dissoziationskonstante  $K_{S1}$ ) oder an Bindungsstelle 2 und ergibt ES<sub>2</sub> (Dissoziationskonstante  $K_{S2}$ ). Wenn Stelle 2 besetzt ist, wird *p*NP nicht an Stelle 1 binden. Das Binden von *p*NP an Stelle 1 verhindert nicht die Bindung von *p*NP an Seite 2 und es ergibt sich ES<sub>1</sub>ES<sub>2</sub>. ES<sub>1</sub> und ES<sub>1</sub>ES<sub>2</sub> sind katalytisch befähigte Spezies aus denen sich EP und EPS<sub>2</sub> Enzym-Produkt-Komplexe mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  ergeben. Das Produkt wird dabei direkt aus EP

freigegeben (Dissoziationskonstante  $K_p$ );  $EPS_2$  benötigt vorher die Freisetzung von  $pNP$  aus Stelle 2 (Dissoziationskonstante  $K_{pS_2}$ ; siehe Abbildung 10).<sup>56</sup>

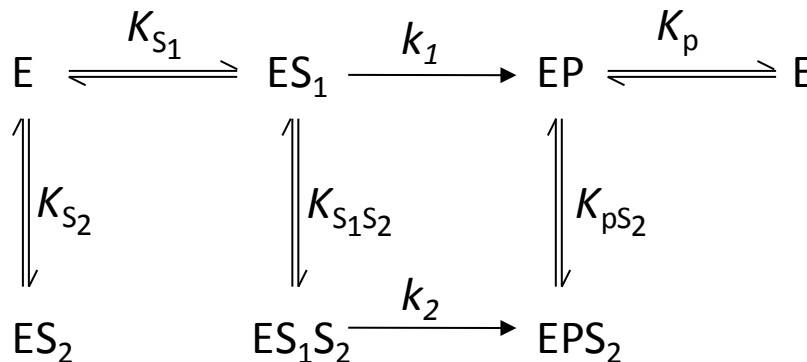


Abbildung 10 Kinetisches Modell zur Substratinhibition bei SULT1A1 mit  $pNP$ <sup>56</sup>

Studien mit SULT1A3 zeigten ebenfalls, dass am aktiven Zentrum zwei Moleküle Dopamin gebunden werden können.<sup>68</sup> Daraus ergibt sich, dass eine Substratinhibition dann stattfindet, wenn bei hoher Substratkonzentration beide Bindungsstellen besetzt sind, welches zu einer eingeschränkten Katalyse führt.<sup>6,56,68</sup>

Wie der Mechanismus der Substratinhibition bei Substraten mit kondensierten Ringsystemen, wie z. B.  $17\beta$ -Estradiol (E2), aussieht, ist nicht vollständig aufgeklärt. Das vorgeschlagene Modell (Abbildung 11) beinhaltet einen „*dead-end*“ Komplex. Zuerst bindet das Enzym E2 und PAPS um SULT:PAPS:E2 zu bilden. Dieser Komplex wird der Katalyse unterzogen, wodurch E2S und PAP freigegeben werden. Alternativ kann der SULT:PAP-Komplex E2 in einem unproduktiven Bindungsmodus gebunden werden und es ergibt sich ein „*dead-end*“ Komplex, der nicht zum sulfonylierten E2 führt. Das Enzym kann der Katalyse wieder zugeführt werden, indem PAP und E2 wieder freigegeben werden.<sup>6,69</sup>

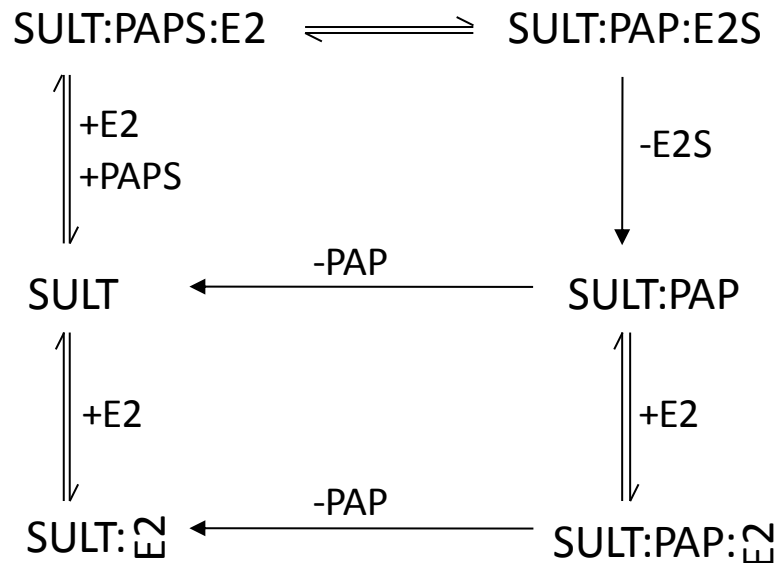


Abbildung 11 Kinetisches Modell zur Substratinhibition von SULT1A1 mit E2<sup>69</sup>

## 2.2 Chemische Synthese von Sulfokonjugaten

Hydroxy-Derivate (Phenole und aliphatische Alkohole) können durch eine Reaktion mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex, Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex oder Chlorsulfonsäure in N,N-Dimethylformamid, in Pyridin oder Dioxan bei moderater Temperatur sulfokonjugiert werden.<sup>70-72</sup> Die Reaktion von Phenolen mit Schwefelsäure wird als weniger erfolgreich beschrieben, da zusätzlich eine elektrophile aromatische Substitution stattfinden kann.<sup>73</sup> So wird die Synthese von Dopamin-4-O-Sulfat und Dopamin-3-O-Sulfat mit Schwefelsäure von den Nebenprodukten Dopamin-5-Sulfonsäure und Dopamin-6-Sulfonsäure in erheblicher Menge begleitet.<sup>74</sup> Untersuchungen zur Herstellung von Steroid-Sulfokonjugaten mit Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex zeigten, dass bei einer Erhöhung von 1,1 Äquivalenten Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex auf 5,0 Äquivalente und eine Ausweitung der Reaktionsdauer von 2 h auf 3 h, ein Gemisch von *mono*- und *bis*-Sulfokonjugaten entsteht. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf 90-95° C erbrachte eine komplette Umsetzung zum *bis*-Sulfokonjugat.<sup>75</sup> Um bei Molekülen mit mehreren Hydroxy- und/oder Phenolgruppen eine selektive Synthese zu erreichen, muss mit Schutzgruppen gearbeitet werden. Da die Sulfonierung der Aminfunktion auch eine konkurrierende Nebenreaktion darstellt, kann auch die Aminfunktion geschützt werden,

um höhere Ausbeuten des gewünschten Sulfatesters zu erhalten. So berichten Harbeson *et al.* bei der Herstellung von Dopamin-Sulfokonjugaten vom Schützen der Aminfunktion durch eine *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) mit anschließender Umsetzung mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex. Ein Gemisch von Boc-geschütztem Dopamin-4-O-Sulfat und Dopamin-3-O-Sulfat wird durch Trifluoressigsäure entschützt und das Gemisch durch Waschen mit Wasser (H<sub>2</sub>O) von Dopamin-3-Sulfat getrennt.<sup>76</sup>

Das Ausmaß der Stabilität von Sulfokonjugaten gegenüber Hydrolyse ist stark von der Struktur und den Bedingungen abhängig. Bei der sauren Hydrolyse von Aryl-Sulfokonjugaten wird bei der Anwesenheit von elektronenziehenden Substituenten am aromatischen Ring diese erhöht. Das Ausmaß der Hydrolyse eines Aryl-Sulfokonjugates ist abhängig von der Säurestärke des Phenols. Aryl-Sulfokonjugate werden unter sauren Bedingungen schneller hydrolysiert als Alkyl-Sulfokonjugate. Unter alkalischen Bedingungen ist die Hydrolyse langsamer und komplexer, da sowohl eine Spaltung der C-O- als auch der S-O-Bindung stattfindet. Bei pH-Werten die größer als 12 sind, ist das Ausmaß der Hydrolyse direkt proportional zur Konzentration der Hydroxidionen. In neutraler Lösung findet die Hydrolyse langsamer statt und ist nur bei labilen Aryl-Sulfokonjugaten von Bedeutung.<sup>54</sup>

### 2.3 *In vitro*-Metabolismus

Die überwiegende Anzahl der *in vitro*-Studien zum Metabolismus von Xenobiotika im Menschen wurden mit subzellulären Fraktionen durchgeführt. Der Begriff subzelluläre Fraktionen bezieht sich auf die mikrosomalen (Vesikel des endoplasmatischen Retikulums), cytosolischen oder S9 (Leberhomogenat nach Entfernen der Zellkerne und Mitochondrien) Fraktionen von Leberhomogenaten.

Subzellulären Fraktionen sind in der Wirkstoffforschung weit verbreitet und werden in der präklinischen Entwicklung von Medikamenten verwendet, um den *in vitro*-Metabolismus von Wirkstoffkandidaten zu bewerten. Metabolische Stabilität, maximale hepatische *Clearance* (*in vitro* intrinsische *Clearance*), Reaktions-Phänotypisierung und die Hemmung von CYP-450-Enzymen und Uridindiphosphat-Glycosyltransferasen können nach Experimenten mit subzellulären Fraktionen beurteilt werden. Subzelluläre Fraktionen der Leber von Menschen und anderen toxikologisch relevanten Arten

(Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde und Affen) werden häufig verwendet, um Artenunterschiede und Gemeinsamkeiten in der Metabolitenbildung zu bewerten. Subzelluläre Fraktionen aus Leber und Dünndarm werden verwendet, um das Potential für einen präsystemischen *First-Pass*-Metabolismus von oral verabreichten Medikamenten zu überprüfen. Subzelluläre Fraktionen aus Dünndarm, Niere und Lunge werden häufig verwendet, um das Potential für den extrahepatischen Metabolismus eines Arzneimittelkandidaten zu bewerten.<sup>77</sup> Neben der Möglichkeit, den Metabolismus von Xenobiotika zu bewerten, können mit diesem Verfahren auch Referenzsubstanzen synthetisiert werden, die anschließend zur Charakterisierung und Strukturaufklärung der Metaboliten herangezogen werden können.<sup>46,78-80</sup>

## 2.4 Analytik von Sulfokonjugaten

### 2.4.1 Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie

#### 2.4.1.1 Atmosphärendruck-Ionisation

Um Analyte massenspektrometrisch erfassen zu können, müssen diese nach chromatographischer Auftrennung (z.B. Flüssigkeitschromatographie, *liquid chromatography*, LC) in Gasphasen-Ionen überführt werden, um sie im Massenspektrometer analysieren zu können. Dazu werden unter Anderem die Elektrospray Ionisation (ESI) und die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (*atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI) benutzt. An dieser Stelle soll die ESI näher vorgestellt werden, da ausschließlich sie zur Analytik der Sulfokonjugate benutzt wurde. Eine Analytenlösung gelangt aus der LC durch eine Stahlkapillare, an der eine Spannung anliegt (3 bis 5 kV), in die Ionenquelle. Wenn die Lösung aus der Kapillare austritt, wandern aufgrund der Potentialdifferenz zwischen Kapillare und Gegenelektrode, je nach Polarität negative oder positive Ionen an die Oberfläche der Flüssigkeitströpfchen. Gegen diesen Zug wirkt die Oberflächenspannung der Lösung und es bildet sich der sogenannte Taylor-Konus. Aus dem Kegel lösen sich geladene Tröpfchen ab, die mit Unterstützung von Gas (N<sub>2</sub>-Strom um die Kapillare) und Temperatur durch Verdunstung immer kleiner werden. Je kleiner die Tröpfchen werden,

desto größer wird die Ladungsdichte. Ist die elektrostatische Abstoßung der Ionen im Tröpfchen genauso groß wie die der Oberflächenspannung, ist das Rayleigh-Limit erreicht. Übersteigt die elektrostatische Abstoßung dieses, kommt es zur Coulomb-Explosion, bei der kleinste Tröpfchen mit oft nur einem Ion entstehen (*charge residue model*, CRM). Eine andere Theorie besagt, dass bereits vor der Coulomb-Explosion große Moleküle von der Oberfläche der Tröpfchen in die Gasphase übergehen (*ion evaporation model*, IEM).<sup>81</sup>

### 2.4.1.2 Tandem-Massenspektrometrie

In der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) werden hauptsächlich *Triple*-Quadrupole, Ionenfallen (u.a. lineare Ionenfallen, *linear ion trap*, LIT), Quadrupol- *time of flight* (Q-TOF), Orbitraps in Kombination mit Quadrupolen oder Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometern (FTICR) als Massenanalysatoren benutzt. Orbitrap, Q-TOF und FTICR liefern Daten mit hochaufgelösten Massen von Quasimolekül- und Produktionen und sind deshalb ein gutes Hilfsmittel zur Strukturaufklärung von unbekannten Metaboliten.<sup>82</sup> Da im Rahmen dieser Arbeit die Analytik mit *Triple* Quadrupol-Massenspektrometer, LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>-Hybrid-massenspektrometer und Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer durchgeführt wurde, soll im Folgenden auf diese Geräte eingegangen werden.

#### *Triple* Quadrupol-LIT-Massenspektrometer

Die bei der ESI je nach Polarität oft einfach protonierten Analytenmolekülionen der Form  $[M+H]^+$  oder die deprotonierten Analytenmolekülionen der Form  $[M-H]^-$  gelangen über ein *Interface* in den Massenanalysator. Das Interface dient dazu die Ionen von der Ionenquelle mit Atmosphärendruck in den Vakuumbereich zu transportieren und besteht bei den hier verwendeten Instrumenten aus Curtain Plate, Orifice und Skimmer oder anderen ionenfokussierenden Bauteilen wie dem QJet<sup>TM</sup>. *Triple*-Quadrupol-Instrumente bestehen eigentlich aus vier Quadrupolen. Q0 ist dabei ein Hilfsquadrupol, der nur mit Wechselstrom betrieben wird, um ein besseres Eintreten der Ionen in den zentralen Ionenweg zu gewährleisten. Das Fokussieren der Ionen im Vorvakuumbereich (ca. 1 Pa) des Q0 wird durch Stickstoff unterstützt, indem die Ionen durch „sanfte“ Kollision abgebremst werden. Im Hochvakuumbereich des Gerätes ( $1,3 \times 10^{-3}$  Pa)



befinden Q1, Q2 und Q3. Q1 und Q3 dienen als Massenanalysator in denen die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) aufgetrennt werden können. Q2 führt die Ionen durch eine Kollisionskammer, die mit Gas (z.B. Stickstoff, Helium oder Argon) gefüllt werden kann. Die Ionen fragmentieren durch die Kollision mit Gasmolekülen, wobei die  $m/z$  der entstandenen Produktionen in dem Messquadrupol Q3 bestimmt werden können. Da die Ionen in einem Quadrupol-Analysator nur eine niedrige kinetische Energie besitzen, werden sie vor der Stoßaktivierung zusätzlich mit einer Kollisionsenergie von etwa 20-150 V beschleunigt, um eine effektivere Fragmentierung zu erhalten. Der Gasdruck in der Kollisionszelle stellt einen weiteren Parameter dar, der die Fragmentierung beeinflusst. Mit zunehmendem Druck steigt die Anzahl der Mehrfachstöße und somit auch die Anregungsenergie. Die Fragmentierung durch niedrigerenergetische Stöße wird als Kollisions-induzierter Zerfall (*collision induced dissociation*, CID) bezeichnet.<sup>83,84</sup> Bei den hier verwendeten Geräten können für eine besonders empfindliche Detektion verschiedenen Messmodi unter Verwendung der LIT ausgewählt werden. Dabei wird z.B. im *enhanced product ion scan* (EPI) der Q3 als LIT verwendet, um ein Massenspektrum aller nach CID entstandener Produktionen aufzunehmen. So erhält man ein MS/MS-Spektrum welches charakteristisch für dieses spezifische Ion ist.

#### LIT-Orbitrap-Hybridmassenspektrometer

Sogenannte Orbitrap-Massenspektrometer werden unter anderem zur Bestimmung akkurater Massen und Elementarzusammensetzung von kleinen Molekülen eingesetzt. Beim LIT-Orbitrap<sup>TM</sup>-Hybridmassenspektrometer gelangen die Ionen zuerst aus einer Elektrospray-Ionenquelle über verschiedene Ionenoptiken in eine LIT (LIT<sup>TM</sup>, *linear trap quadrupole*), die auch eine Fragmentierung der Analyten ermöglicht. Nachdem die Ionen in einer C-förmigen Ionenfalle (*curved linear trap*, *C-Trap*) gebremst und gekühlt werden, gelangen diese in die Orbitrap. Diese besteht aus einer spindelförmigen inneren Elektrode und einem äußeren Elektrodenpaar. Die Ionen oszillieren nun um die innere Elektrode. Die  $m/z$ -Werte werden durch die Fouriertransformation des durch sie induzierten Stromes in der Orbitrap erhalten. Optional kann eine MS/MS-Fragmentierung in der Hochenergiezelle für stoßinduzierte Dissoziation (HCD-Zelle) durchgeführt werden (MS<sup>n</sup>). Die Orbitrap zeichnet sich durch eine sehr hohe Auflösung

von >100.000 *full width at half maximum* (FWHM) und Massengenauigkeit (< 3 ppm) aus (*high resolution accurate mass spectrometry*, HRMS).<sup>81</sup>

### Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer

Ein Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer kombiniert die Selektion eines Vorläufers mittels Quadrupol mit der hochaufgelösten, massengenauen Orbitrap-Detektion. Die Ionen gelangen für eine Vorläuferselektion zuerst aus einer Elektrospray-Ionenquelle durch eine Reihe von Ionenoptiken in den Quadrupol. Die MS/MS-Fragmentierung findet in der Hochenergiezelle für stoßinduzierte Dissoziation (HCD-Zelle) vor dem Nachweis mittels Orbitrap statt. Außerdem besteht die Möglichkeit *Full-Scan*-Experimente mit erhöhter Auflösung von bis zu 140.000 FWHM durchzuführen.<sup>85</sup>

#### 2.4.1.3 Spezielle Massenspektrometrie von Sulfokonjugaten

Die Möglichkeit der besonders milden Ionisation mittels ESI erlaubt die Analyse der intakten polaren Phase-II-Metaboliten durch LC-MS/MS. Ionenfallen können durch MS<sup>n</sup>-Experimente Produktionen des intakten Konjugates von Produktionen des Aglykons unterscheiden, indem die Fragmentierung durch MS<sup>3</sup>-Experimente untersucht wird.<sup>82</sup> Die Einführung einer Sulfatgruppe erhöht die Masse des Quasimoleküls um 80 Da. Die Acidität und Basizität der Analyten bestimmt, ob diese bevorzugt positiv oder negativ ionisiert werden können. In MS/MS-Spektren der deprotonierten Quasimoleküle [M-H]<sup>-</sup> von Sulfokonjugaten, die im negativen Modus aufgenommen wurden, dominiert der Verlust von SO<sub>3</sub> (80 Da), neben dem weniger intensiven Verlust von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98 Da). Alternativ kann die Ladung an der Sulfatgruppe lokalisiert sein, um zum Radikalion von *m/z* 80 (SO<sub>3</sub><sup>-•</sup>) oder dem weniger intensiven Produktion bei *m/z* 97 (HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>) zu führen. Im positiven Modus wird ebenfalls der Verlust von SO<sub>3</sub> (80 Da) beobachtet.<sup>73,82</sup>

#### 2.4.2 Kernspinresonanzspektroskopie von Sulfokonjugaten

Da Sulfatgruppen selbst mittels NMR-Spektroskopie nicht zu detektieren sind, kann man lediglich indirekte Informationen aus den Spektren gewinnen. Da die Substituenten am aromatischen Ring das Kopplungsmuster und die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen beeinflussen, kann man die Position der Sulfonierung im

Vergleich zu einem Spektrum des Aglykons ermitteln. So sind die Protonen, die am selben Kohlenstoff gebunden sind wie das O-Sulfat, entschirmt und um etwa 0,5 ppm im Vergleich zum Aglykon tieffeldverschoben.<sup>73,74</sup>

## 2.5 Missbrauch von $\alpha$ - und $\beta$ -Sympathomimetika im Sport

Durch ihre direkte oder indirekte Beeinflussung der NA-Konzentration können  $\alpha$ -Sympathomimetika im Sport missbräuchlich eingesetzt werden. Aufgrund ihrer Wirkung, die sich in verstärkter Wachheit, einem erhöhten Aktivitätsniveau, einer motorischen Antriebssteigerung, einem verminderten Müdigkeitsempfinden, einer Atemstimulation und einer Appetithemmung bemerkbar macht, sind diese Substanzen von der WADA für die Verwendung im Wettkampf verboten.<sup>1,16</sup>

Im Sport bietet der Einsatz von  $\beta_2$ -Agonisten die Möglichkeit einer Leistungssteigerung, da sie bronchodilatatorisch wirken, die antiinflammatorische Wirkung von Corticosteroiden verbessern und anabole Wirkung haben. Auch wenn eine Leistungssteigerung durch die Inhalation therapeutischer Dosen unwahrscheinlich ist, kann ein anaboler Effekt auf Muskeln möglicherweise mit hohen inhalierten Dosen oder durch andere Applikationswegen erreicht werden. Anabole Effekte sind insbesondere für Clenbuterol beschrieben.<sup>86</sup> Wegen der hier beschriebenen Effekte sind  $\beta_2$ -Sympathomimetika von der WADA für die Benutzung durch Sportler verboten. Ausgenommen hiervon sind Salbutamol, Formoterol und Salmeterol, wenn diese inhalativ, gemäß Zulassung des Medikaments angewendet werden.<sup>1</sup>

Im Jahr 2012 waren 15,5 % der weltweit gemeldeten positiven Doping-Fälle der Substanzklasse der Stimulanzen zuzuordnen. In 8,3 % der Fälle handelte es sich um Amphetamin, 4,4 % entfielen auf Methamphetamin (D-), 0,9 % auf Dextroamphetamin, 0,4 % auf Octopamin, 0,1 % auf Etamivan und 0,1 % auf *p*-Hydroxyamphetamin. 2,9 % der 2012 weltweit gemeldeten Verstöße gegen den World Anti-Doping Code entfielen auf die Substanzklasse der  $\beta_2$ -Agonisten. In 89,3 % der Fälle handelte es sich um Terbutalin, 4,6 % entfielen auf Salbutamol und 3,8 % auf Fenoterol.<sup>87</sup>

## 2.6 $\alpha$ - und $\beta$ -Sympathomimetika in der Dopinganalytik

Die Nachweistekniken für Sympathomimetika in der Dopinganalytik müssen für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Agonisten unterschieden werden. Die Unterschiede im Nachweis der beiden Substanzklassen sind durch die unterschiedlichen Dosierungen und Applikationswege, aber auch durch die chemischen Eigenschaften der Substanzen bedingt. Für beide Gruppen eignet sich eine ähnliche Probenvorbereitung, wobei der Nachweis auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen muss. Mehrere Methoden zur Probenvorbereitung sind bereits beschrieben worden; die meisten beinhalten entweder eine flüssig-flüssig-Extraktion oder eine Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE). Die flüssig-flüssig-Extraktion erfolgt bei basischem pH-Wert mit *tert*-Butylmethylether (TBME). Der Extraktion geht teilweise eine enzymatische oder chemische Hydrolyse voraus, um Glucuronide oder Sulfokonguate als Phase-II-Metaboliten zu spalten. Phase-I-Metaboliten scheinen in geringem Maß ausgeschieden zu werden, so dass die Urinproben überwiegend auf die Aglykone hin untersucht werden können.<sup>17,88-91</sup> Aufgrund der Aminfunktion und der Flüchtigkeit einiger  $\alpha$ -Sympathomimetika, vor allem der Stimulanzien, hat sich zum Nachweis die gaschromatographische Auftrennung mit Stickstoff-Phosphor-Detektion und/oder massenspektrometrischer Detektion, teilweise mit vorangegangener Derivatisierung, durchgesetzt.<sup>39,88,90,92-97</sup> Eine Reihe von LC-MS/MS-Methoden wurden für den Nachweis von  $\beta_2$ -Agonisten beschrieben. Durch die leichte Protonierbarkeit der Substanzen wird eine zeitaufwendige und komplexe Probenvorbereitung mit Hilfe von Derivatisierung vermieden.<sup>91,98-100</sup>

Analytische Verfahren zum Nachweis von Dopingsubstanzen aus urinärer Matrix befinden sich in einem stetig voranschreitenden Prozess. Die direkte Injektion von Urin ohne Probenvorbereitung, wie z. B. Hydrolyse, Fest- oder Flüssigextraktion wird immer populärer, da sie zeit- und kostensparend ist.<sup>2-4</sup> Der Nachweis von im Sport verbotenen Substanzen mittels Direktinjektionsmethoden fordert ein breites Wissen über den Metabolismus dieser Substanzen. Insbesondere muss der Phase-II-Metabolismus untersucht werden, da keine Hydrolyse durchgeführt wird. Ist dieses Wissen vorhanden, können in einer Prozedur Substanzen, die weitgehend konjugiert ausgeschieden werden, mit solchen kombiniert werden, die nur in einem geringen Ausmaß Phase-I oder Phase-II-Metabolismus erfahren (z. B. Diuretika).

### 3 Experimenteller Teil

#### 3.1 Synthese und Charakterisierung von Referenzverbindungen

##### 3.1.1 Untersuchung verschiedener Sulfonierungsreagenzien in Reaktion mit Etilefrin

Für die Untersuchung einer möglichen Selektivität oder Präferenz der Sulfonierungsposition, wurden Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex, Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex und 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat in Reaktion mit Etilefrin getestet.<sup>73,74,101</sup> Etilefrin (Abbildung 4) besitzt neben einer phenolischen Funktion eine weitere, alkyliche Hydroxygruppe. Des Weiteren enthält die Substanz ein sekundäres Amin und ist somit strukturverwandt mit den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen. Da Etilefrin-Hydrochlorid (Etilefrin x HCl) preiswerter als die anderen in dieser Arbeit behandelten Substanzen ist, wurden die Untersuchungen zum Sulfonierungsverhalten mit Etilefrin x HCl als Modellsubstanz durchgeführt. Nach oraler Einnahme von Etilefrin kann man im Urin ein Sulfokonjugat nachweisen. Es wird angenommen, dass die phenolische Gruppe von Etilefrin der Akzeptor der Sulfatgruppe ist.<sup>21</sup> Mit den hier durchgeführten Versuchen wurde untersucht, ob eines der Sulfonierungsreagenzien selektiv nur eine der beiden Hydroxygruppen verestert.

Zur Untersuchung der Bildung der verschiedenen Syntheseprodukte wurden Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen aufgenommen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1). Des Weiteren wurde zur Charakterisierung der Sulfokonjugate von Etilefrin MS<sup>2</sup>-Experimente mittels HRMS durchgeführt (Etilefrin:  $m/z$  182,12; Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugate:  $m/z$  262,07; Etilefrin-*bis*-Sulfokonjugat:  $m/z$  342,03; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.6).

###### 3.1.1.1 Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe

Für die Beobachtung des Reaktionsverhaltens der beiden Sulfonierungsreagenzien, wurde jeweils Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex oder Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex in äquimolarem Verhältnis mit Etilefrin x HCl als Modellsubstanz bei

Raumtemperatur bei einer Konzentration von 10 mg/mL in Pyridin gerührt. Zur Überprüfung wie viel der Produkte entstanden ist, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu einem Endpunkt von 30 h jeweils ein Aliquot von 1 µL entnommen, zur Trockne eingedampft und in 200 µL Ammoniumacetatpuffer (5 mM; 1 mL/L Eisessig; pH 3,5) / Acetonitril (ACN) 80:20 (v:v) angelöst und gemessen.

### 3.1.1.2 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat

2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat wurde hergestellt, indem zu 9,65 mL (107,2 mmol) Trichlorethanol in 8,15 mL Pyridin und 40 mL Toluol eine Mischung von 8,0 mL (99,0 mmol) Sulfurylchlorid in 75 mL Toluol tropfenweise über 45 min hinzugegeben wurde. Diese Mischung rührte bei ca. -60 °C (Aceton/Trockeneis-Mischung) für 2 h. Dieser Ansatz wurde unter Vakuum eingeengt.<sup>101</sup>

Für die Umsetzung mit Etilefrin wurde 0,328 g (1,5 mmol) Etilefrin x HCl in 10 mL Pyridin gelöst und für 1 h im Eisbad gerührt. Anschließend wurden 600 µL des oben genannten Ansatzes in 5 mL Pyridin gelöst und tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch von 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat und Etilefrin wurde 16 h bei 0 °C gerührt. Nach dem Einengen wurde der Ansatz in 20 mL Methanol (MeOH) und 20 mL Phosphatpuffer (1,70 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 1000 g H<sub>2</sub>O; pH 7,2) wieder aufgenommen. Um den 2,2,2-Trichlorethylester zu spalten wurde die Mischung mit 5 g frisch aktiviertem Zinkstaub 2 h gerührt und filtriert (siehe Abbildung 24). Diese Reaktion wurde auf eine Präferenz für die Sulfonierungsposition untersucht.

### 3.1.2 Untersuchungen zu einer möglichen selektiven Synthese des phenolisch veresterten Etilefrin *mono*-Sulfokonjugates

Um eine mögliche selektive Synthese von sulfokonjugierten Phenolen zu entwickeln, die gleichzeitig eine benzyliche Hydroxygruppe in ihrer Struktur aufweisen, wurden exemplarisch mit der Modellsubstanz Etilefrin verschiedene Schutzgruppenversuche durchgeführt. Dabei wurde die benzyliche Hydroxygruppe als mögliche Konkurrenzfunktion bei einer Sulfonierung geschützt. Da die sekundäre Aminfunktion möglicherweise bei der Sulfonierung und bei der Einführung einer Schutzgruppe eine Konkurrenzfunktion darstellt, wurden auch Versuche durchgeführt, um zusätzlich diese

Gruppe zu schützen. Zur Untersuchung der Bildung der verschiedenen Syntheseprodukte wurden neben der chromatographischen Trennung Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen aufgenommen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1).

### 3.1.2.1 Dimethyloxazolidin-Derivat

Um die benzyliche Hydroxygruppe und die sekundäre Aminfunktion gleichzeitig zu schützen, wurde eine Derivatisierung zu einem Oxazolidin-Derivat durchgeführt. Zur Bildung eines Dimethyloxazolidin-Derivates wurde Etilefrin (**1**) und Aceton unter Zusatz von Calciumcarbid ( $\text{CaC}_2$ ) kondensiert. Die anschließende Umsetzung mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex erfolgte in Pyridin.<sup>52,73</sup> Die Ringöffnung wurde durch eine Behandlung mit salzsaurem Ether beschrieben.<sup>102</sup>

0,532 g Etilefrin x HCl (2,44 mmol) wurde in 50 mL Aceton dispergiert und mit 0,474 g (7,4 mmol)  $\text{CaC}_2$  76 h unter Rückfluss gerührt. Nach Eindampfen der organischen Phase wurde der Rückstand in 40 mL  $\text{H}_2\text{O}$  deion. wieder aufgenommen und fünf Mal mit 40 mL TBME extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde für die Umsetzung zum Sulfokonjugat in 15 mL Pyridin gelöst und mit 0,540 g (3,39 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Flash-Chromatographie. Eine Säule mit einem Durchmesser von 2,5 cm wurde mit 4,17 g Kieselgel gefüllt und mit Dichlormethan (DCM):TBME (1:1; v:v) konditioniert. Der Ansatz wurde in einem Gemisch aus 35 mL DCM und 5 mL TBME aufgenommen und auf die Säule gegeben. Bei einer Fraktionsgröße von 20 mL wurden die ersten beiden Fraktionen mit einem Fließmittelgemisch von DCM:TBME (50:50; v:v) begonnen. Nach zwei Fraktionen wurde auf 100 % TBME gewechselt, gefolgt von TBME:Ethylacetat (EtOAc) (99:1; v:v). Nach schrittweiser Erhöhung auf 100 % EtOAc folgte ein Gemisch von EtOAc:MeOH (99:1; v:v). Durch Erhöhung des polaren Anteils, begann der Ansatz bei einem Lösungsmittelverhältnis von EtOAc:MeOH (50:50; v:v) zu eluieren. Die Fraktion mit dem höchsten Anteil an sulfokonjugiertem Produkt wurde erneut einer Flash-Chromatographie unterzogen, da außer dem Edukt noch ein Anteil an Etilefrin (**1**) im Ansatz enthalten war. Die beiden Fraktionen (40 mL) wurden zur Trockne abgedampft, in 55 mL EtOAc:MeOH (90:10; v:v) aufgenommen und auf eine Kartusche mit 5 g

Kieselgel gegeben, welches mit demselben Lösungsmittelgemisch konditioniert war (Fraktionsgröße 10 mL). Durch Erhöhung des MeOH-Anteils in 10 % -Schritten konnte das Gemisch weiter getrennt werden, und eine saubere Fraktion mit einer kleinen Menge an sulfokonjugiertem Produkt erhalten werden.

Um die Stabilität des Sulfokonjugates bei einer Ringöffnung zu untersuchen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dazu wurde ein Äquivalent des sulfokonjugierten Produktes in 5 ml 2 M Salzsäure-Diethylether für 1 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz unter Vakuum zur Trockne eingengt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen.<sup>102</sup>

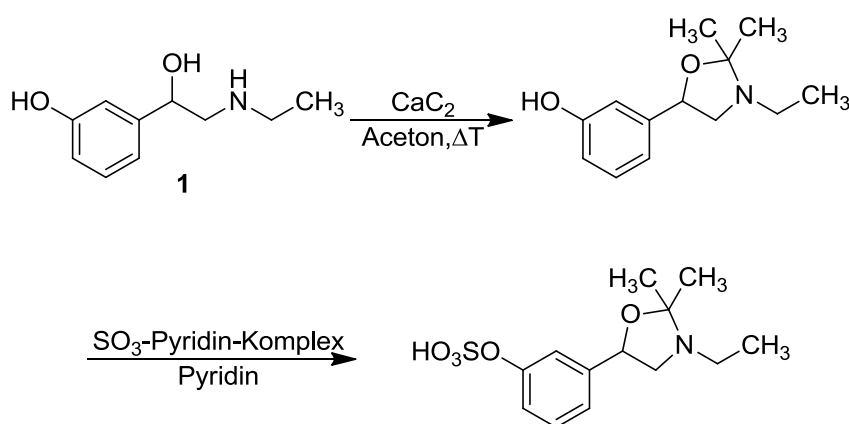


Abbildung 12 Erwartete Umsetzung von Etilefrin (1) zum Dimethyloxazolidin-Derivat nach Yuan *et al.*<sup>102</sup> mit anschließender Sulfonierung

### 3.1.2.2 Veresterung mit Ameisensäure

Dusza *et al.*<sup>103</sup> beschreiben die selektive Synthese von wasserlöslichen Estrogensulfokonjugaten unter Benutzung von Formiat als Schutzgruppe. Zum Entschützen wird 1 h unter Rückfluss in MeOH und Triethylamin gerührt.

Zur Veresterung wurden 0,100 g (0,46 mmol) Etilefrin x HCl mit 0,014 g (0,08 mmol) *p*-Toluensulfonsäure in 2,36 mL Ameisensäure (99 %, 62,55 mmol) und 0,29 mL  $\text{H}_2\text{O}$  30 min im heißen Wasserbad gerührt und anschließend 19 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Zum Aufreinigen des Reaktionsansatzes wurde eine Flash-Chromatographie durchgeführt. Der Ansatz wurde in 18 mL eines Gemischs von EtOAc:TBME:MeOH (3:2:1; v:v) durch Erhitzen gelöst und auf eine Säule mit 3,0 g



Kieselgel (konditioniert mit TBME:EtOAc (1:1; v:v)) gegeben. Durch schrittweise Erhöhung des polaren Anteils, wurde das Gemisch von der Säule eluiert.

### 3.1.2.3 Boc-Schutzgruppe mit angeschlossener Oxidation

Graves et al.<sup>104</sup> berichten eine Oppenauer-Oxidation von Ephedrin, bei der die benzyliche Hydroxylfunktion durch Oxidation geschützt wird. Dabei wird die Aminofunktion zunächst als *tert*-Butylcarbammat (Boc-Derivat) geschützt, indem die Verbindung mit Di-*tert*-butyldicarbonat versetzt wird. Die Oppenauer-Oxidation wurde mit Trimethylaluminium ( $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ ) in Toluol durchgeführt. Nach diesem Schritt kann eine Sulfonierung durchgeführt werden. Danach ist eine Behandlung mit einem milden reduzierenden und damit entschützenden Reagenz notwendig, damit das Sulfokonjugat intakt bleibt und nicht hydrolysiert wird. In der Literatur werden verschiedene Verfahren zum Entschützen einer Boc-Gruppe beschrieben. So wird die saure Abspaltung einer N-Boc-Gruppe durch konzentrierte Salzsäure in Aceton<sup>105</sup> und mit wässriger 85 %iger Phosphorsäure<sup>106</sup> beschrieben. Unter basischen Bedingungen wurde die Abspaltung von Boc-Gruppen durch Natriumcarbonat in Dimethylether beschrieben.<sup>107</sup>

1,35 g Etilefrin x HCl (6,20 mmol) und 2,11 g (15,23 mmol)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  wurden in 12,5 mL MeOH und 12,5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. 2,16 g (9,88 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat wurden anschließend dazugegeben und für 48 h gerührt. Dieser Ansatz wurde drei Mal mit 40 mL EtOAc extrahiert, die organischen Phasen anschließend vereinigt und unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 7 mL wasserfreiem Toluol gelöst und unter Rühren wurden 130  $\mu\text{L}$  einer 2 M Lösung von  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  in Toluol tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurde 1,18 g (7,83 mmol) 3-Nitrobenzaldehyd in 7 mL wasserfreiem Toluol hinzugegeben und für 30 min gerührt. Diesem Ansatz wurden 50 mL TBME hinzugefügt, er wurde drei Mal mit 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend die organische Phase unter Vakuum zur Trockne eingengt. Zur Sulfonierung wurde zu diesem Rückstand 1,18 g (7,4 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex gegeben und in 40 mL Pyridin für 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

### 3.1.2.4 Methylboronat-Derivat

Damasceno et al.<sup>92,96</sup> entwickelten eine Derivatisierungsmethode für  $\beta_2$ -Agonisten zur GC-MS-Analyse. Bei der Reaktion von Trimethylboroxin (cyclisches Anhydrid von Methylborsäure) mit  $\beta$ -Hydroxyaminen entsteht in wasserfreiem EtOAc ein cyclisches Methylboronat-Derivat, welches in  $H_2O$  instabil ist. Die Reaktion erfolgte in einem kleinen Maßstab, um die Reaktion des Methylboronat-Derivates mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex in Pyridin zu beobachten. Dabei sollte eine mögliche Selektivität oder bevorzugte Sulfonierungsposition untersucht werden.

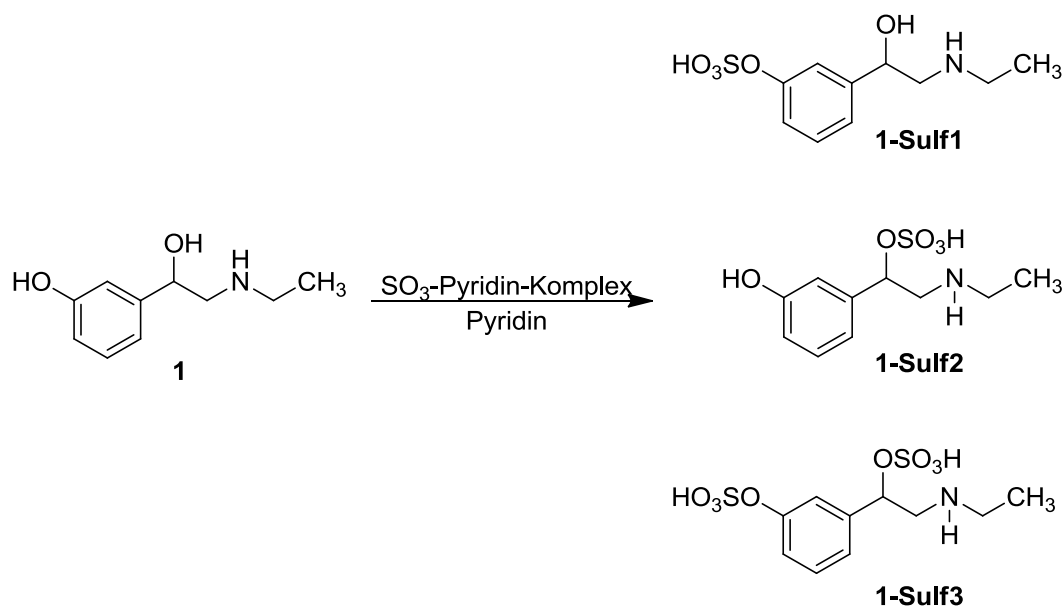
Zu 1 mg Etilefrin x HCl (0,005 mmol) wurde 1 mL (15,9 mmol) einer Lösung von Trimethylboroxin in trockenem EtOAc (2 mg/mL) hinzugefügt und 90 min bei 60 °C gerührt. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels wurden 11 mg (0,1 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex hinzugegeben und in 1 mL Pyridin 48 h bei Raumtemperatur gerührt.

### 3.1.3 Kontrollierte Sulfonierung von Etilefrin

Um bessere Ausbeuten für die phenolisch konjugierten Sulfate bei der Synthese der Edukte mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zu erhalten, wurde die Bildung der zwei möglichen *mono*-Sulfokonjugate von Etilefrin und die Bildung eines *bis*-Sulfokonjugates (siehe Abbildung 13) unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Dazu wurde das Verhältnis der Edukte, die Konzentration der Edukte und die Temperatur variiert, um optimale Reaktionsbedingungen für die Bildung des phenolisch *mono*-sulfonierten Produktes zu untersuchen.

In einem ersten Versuch wurde Etilefrin insgesamt 141 h bei 4, 25, 60 und 80 °C in molaren Verhältnissen von jeweils 1:5, 2:5, 3:5, 4:5 und 5:5 Etilefrin (10 mg Etilefrin/ mL Pyridin) zu Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex gerührt.

In einem zweiten Versuch wurden Etilefrin und Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex 24 h in einem molaren Verhältnis von 1:1 in den Konzentrationen 5, 10, 25 und 50 mg Etilefrin/ mL Pyridin gerührt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben von den verschiedenen Ansätzen genommen und mittels LC-MS/MS (Bedingungen siehe Kapitel 3.3) überprüft.

Abbildung 13 Sulfonierung von Etilerfrin (**1**) zu den möglichen Produkten

### 3.1.4 Untersuchung der *in vitro*-Sulfonierung von Fenoterol

Die *in vitro*-Synthese der Sulfokonjugate von Fenoterol wurde in Anlehnung bereits veröffentlichter Methoden durchgeführt.<sup>78-80,108</sup> Dabei wurde die Sulfokonjugat-Synthese bei verschiedenen Enzympräparationen unterschiedlicher Gewebe, bei steigender initialer Fenoterol-Konzentration, bei verschiedener Inkubationszeit sowie bei variierender PAPS-Konzentration untersucht. Als Gewebepräparationen wurden humane Leber S9-Fraktion (hLeS9), humane Lungen S9-Fraktion (hLuS9, Nichtraucher), humane Intestinum S9-Fraktion (hIS9), humane Nieren S9-Fraktion (hNS9) und humanes Lebercytosol (hLeC) auf ihr Sulfonierungsvermögen hin untersucht (alle in einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL). Zusätzlich wurden zwei rekombinant hergestellte Sulfotransferasen (SULT1A1\*1 (im Folgenden SULT1A1 bezeichnet) und SULT1A3) auf ihr Sulfonierungsvermögen hin untersucht (beide mit einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/mL). Verschiedene Reaktionsansätze mit den Substratkonzentrationen 10, 50, 100 und 250  $\mu\text{M}$  Fenoterol in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4; enthielt 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und 50  $\mu\text{M}$  PAPS wurden präpariert. Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Konzentration von PAPS vorteilhaft für die Bildung der Sulfokonjugate ist, wurde mit jedem Gewebe und den beiden rekombinanten SULTs ein Versuch mit 100  $\mu\text{M}$  PAPS bei einer konstanten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Fenoterol durchgeführt. Nach Zugabe der Enzympräparate

wurden die Ansätze bei 37 °C in einem Endvolumen von 100 µL für 1 h, 1,5 h und 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils mit 100 µL eiskaltem ACN gestoppt und das dabei präzipitierte Protein mittels Zentrifugation bei 17000 *g* für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µL einer Mischung von Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; 1mL/L Eisessig; pH 3,5) / ACN (80:20, v:v) für die LC-MS/MS-Messung wiederaufgenommen. Die Überprüfung der Ansätze zur Bildung der Fenoterol-Sulfokonjugate erfolgte durch die Detektion charakteristischer Ionenübergänge und der Aufnahme von Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1; MRM-Experimente Fenoterol: *m/z* 304-135; sulfokonjugiertes Fenoterol: *m/z* 384-135). Alle *in vitro*-Experimente wurden in doppelter Ausführung vorgenommen.

### 3.1.5 Referenzverbindungen

#### 3.1.5.1 Synthese Octopamin-Sulfokonjugat

Die Synthese von Octopamin-Sulfokonjugat erfolgte, indem 0,51 g (2,69 mmol) Octopamin mit 0,64 g (4,01 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex in 20,0 mL Pyridin für 48 h gerührt wurden. Dieser Ansatz wurde unter Vakuum zur Trockne abgedampft und mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie (Konditionen siehe Kapitel 3.4.4) aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz in 4 mL Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; 1 mL/L Eisessig; pH 3,5) gelöst und jeweils 10 µL in das LC-UV-System injiziert. Die Fraktion von 3,80 min bis 4,20 min enthielt das Octopamin-Sulfokonjugat. Nach Vereinigung und Eindampfen der Fraktionen unter Vakuum, wurde ein Rückstand aus Octopamin-Sulfokonjugat und Ammoniumacetat erhalten. Um sauberes Referenzmaterial zu erhalten, wurde eine mehrfach wiederholte Festphasenextraktion durchgeführt, um das Ammoniumacetat abzutrennen. Das Gemisch wurde in H<sub>2</sub>O angelöst und bei pH 9 mittels Oasis® HLB Kartuschen (200 mg; 6 mL) aufgereinigt. Zur Überprüfung des Vorhandenseins eines Octopamin-Sulfokonjugates in den Fraktionen wurden Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen aufgenommen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.2). Des Weiteren wurde eine HRMS-Charakterisierung durchgeführt und die elementare Zusammensetzung des synthetisierten *mono*-Sulfokonjugates und

von freiem Octopamin bestimmt (Octopamin:  $m/z$  136,08 ( $[M+H-H_2O]^+$ ); Octopamin-*mono*-Sulfokonjugat:  $m/z$  234,04; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.5).

### 3.1.5.2 Synthese Terbutalin-Sulfokonjugat

Für die Synthese von Terbutalin-Sulfokonjugat wurden 0,50 g (1,82 mmol) Terbutalin-Hemisulfatsalz mit 0,59 g (3,68 mmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex in 41 mL Pyridin bei Raumtemperatur für 29 h gerührt.<sup>73,109,110</sup> Das Gemisch wurde anschließend einer umfassenden Aufarbeitung unterzogen. Mit Säulenchromatographie (Propan-2-ol, EtOAc, Ammoniak (17,5 %) (4:4:2; v:v); auf Kieselgel; Säulengröße: innerer Durchmesser 3,5 cm, Betthöhe 38 cm; Fraktionsgröße 50 mL) konnte kein sauberes Produkt gewonnen werden. Die Fraktion mit dem höchsten Anteil an *mono*-Sulfokonjugat (Fraktion nach 600 mL) wurde weiter aufgearbeitet (Propan-2-ol, EtOAc, Ammoniak (17,5 %) (4:5:1; v:v); auf Kieselgel; Säulengröße: innerer Durchmesser 1,7 cm, Betthöhe 38 cm; Fraktionsgröße 50 mL). Dies erbrachte eine saubere Fraktion mit ca. 4 mg phenolisch sulfokonjugiertem Terbutalin (nach 800 mL des Eluenten auf der zweiten Säule) und eine saubere Fraktion mit ca. 1 mg des an der benzylichen Hydroxygruppe sulfokonjugierten Terbutalins (nach 500 mL des Eluenten auf der zweiten Säule). Zur Überprüfung des Vorhandenseins der Sulfokonjugate von Terbutalin in den Fraktionen wurden Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen aufgenommen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1). Des Weiteren wurde eine HRMS-Charakterisierung durchgeführt und die elementare Zusammensetzung der synthetisierten *mono*-Sulfokonjugate von Terbutalin bestimmt (Terbutalin-*mono*-Sulfokonjugate:  $m/z$  306,10; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.5).

### 3.1.5.3 *In vitro*-Synthese Fenoterol-Sulfokonjugat

Die Synthese der verschiedenen Sulfokonjugate von Fenoterol erfolgte als *Scale-up* der Experimente aus Kapitel 3.1.4. Als optimale Bedingungen für die Synthese der drei Sulfokonjugate wurden 250  $\mu$ L SULT1A3 (0,25 mg/mL Protein) mit 50  $\mu$ M Fenoterol (gelöst in 50 mM Phosphatpuffer; pH 7,4; 5 mM  $MgCl_2$ ) und 100  $\mu$ M PAPS in einem Endvolumen von 10 mL für 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem 10 mL eiskaltes ACN hinzugefügt wurde. Das präzipitierte Protein wurde mittels Zentrifugation bei 17000  $g$  für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde in einer Vakuumzentrifuge zur

Trockne eingedampft und mittels präparativer Flüssigkeitschromatographie aufgereinigt (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.4). Dazu wurde der Ansatz in 2 mL Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; 1 mL/L Eisessig; pH 3,5) gelöst und jeweils 40 µL in das LC-UV-System injiziert. Die Fraktionen von 11,75 min bis 15,75 min (alle 0,25 min) wurden gesammelt und auf das Vorhandensein der Sulfokonjugate von Fenoterol hin untersucht. Dazu wurden Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen aufgenommen. Zur Strukturaufklärung der Metaboliten wurden verschiedene Messmodi wie Produktionenscan (EPI), MRM, *Precursor ion scan* ( $m/z$  286) und MS<sup>3</sup>-Experimente (Fenoterol-*mono*-Sulfokonjugate  $m/z$  384-232 und  $m/z$  384-215; Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat als Ammoniumaddukt  $m/z$  481-384) durchgeführt (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.2). Des Weiteren wurde zur Charakterisierung der Sulfokonjugate von Fenoterol MS<sup>2</sup>-Experimente mittels HRMS durchgeführt (Fenoterol:  $m/z$  304,15; Fenoterol-*mono*-Sulfokonjugate:  $m/z$  384,11; Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat:  $m/z$  464,07; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.6).

### 3.1.5.4 Gewinnung von Salbutamol-Sulfokonjugat aus Urin

Urinproben einer Ausscheidungsstudie mit Salbutamol (**10**)<sup>46,111</sup> die einen hohen Gehalt an Salbutamol aufwiesen wurden mittels präparativer LC-UV aufgereinigt (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.4). Dazu wurden die Fraktionen von 8,50 min bis 11,00 min alle 0,25 min gesammelt und auf das Vorhandensein des Sulfokonjugates von Salbutamol (**10-Sulf**) hin untersucht. Die Untersuchung erfolgte anhand von Produktionenspektren entsprechender *Precursor*-Ionen (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1). Des Weiteren wurde zur Charakterisierung des Sulfokonjugates von Salbutamol MS<sup>2</sup>-Experimente mittels HRMS durchgeführt (Salbutamol:  $m/z$  240,16; Salbutamol-Sulfokonjugat:  $m/z$  320,12; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.6).

## 3.2 Ausscheidungsstudien

### 3.2.1 Octopamin

Zur Bestimmung des Ausscheidungsprofils von Octopamin und seinem Sulfokonjugat nach oraler Einnahme von 150 mg Octopamin wurde über zwei Tage kontinuierlich Urin

einer Erwachsenen (28 Jahre, Gewicht 63 kg, weiblich) gesammelt, gefolgt von einem zusätzlichen Morgenurin. Die Probenvorbereitung erfolgte mittels SPE und beinhaltete die Konditionierung der Festphase (Oasis® HLB (60 mg) mit 2 mL MeOH, gefolgt von der Equilibrierung der Festphase mit 2 mL H<sub>2</sub>O. 2 mL der Urinproben wurde auf die Säule gegeben, gefolgt von 500 ng d<sub>3</sub>-Octopamin als ISTD. Die Säule wurde mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und die Analyten mit 2 mL MeOH eluiert. Nach dem Trocknen unter Vakuum wurden die Proben mit 100 µL einer Mischung von Ammoniumacetatpuffer (5 mM; 1mL/L Eisessig; pH 3,5) / ACN (80:20, v:v) wieder angelöst und anschließend mittels LC-MS/MS (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.2) gemessen. Für die Beobachtung des Ausscheidungsprofils von Octopamin und seinem Sulfokonjugat in Urinproben, wurden die Analyten und der ISTD durch charakteristische Ionenübergänge detektiert: Octopamin:  $m/z$  154-119; sulfokonjugiertes Octopamin:  $m/z$  234-136; d<sub>3</sub>-Octopamin (ISTD)  $m/z$  157-139.

Für eine quantitative Bewertung der Ausscheidungsstudie wurde eine Validierung der Probenvorbereitungsmethode durchgeführt. Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wurde definiert als niedrigste Konzentration bei der das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) der jeweiligen Ionenspur  $\geq 3$  ist. Dazu wurden sechs unterschiedliche Blankurinproben jeweils mit 400 ng/mL freiem und sulfokonjugiertem Octopamin versetzt. Die Proben wurden nach der oben beschriebenen Probenvorbereitung behandelt und analysiert. Die Spezifität wurde untersucht, indem 20 verschiedene Blankurinproben (10 von weiblichen Probanden, 10 von männlichen Probanden) nach oben beschriebener Probenvorbereitung aufgearbeitet, analysiert und auf Störsignale hin in den Ionenchromatogrammen zur erwarteten Retentionszeit untersucht wurden. Für die Wiederfindungsrate wurden sechs Urinproben mit 2 µg/mL der beiden Analyten versetzt und wie oben beschrieben aufgearbeitet. Eine weitere Reihe von sechs Urinproben wurde aufgearbeitet indem lediglich der ISTD hinzugegeben wurde und die beiden Analyten (2 µg/mL) erst nach der SPE zur Probe gegeben wurden. Die Präzision wurde getestet indem jeweils sechs angereicherte Urinproben (jeweils 0,5, 2 und 4 µg/mL der beiden Analyten) aufgearbeitet und analysiert wurden.

### 3.2.2 Terbutalin

Für das Ausscheidungsprofil von Terbutalin und seinem Sulfokonjugat wurde eine Retardkapsel Terbutalin (7,5 mg des Sulfatsalzes) jeweils von drei gesunden Erwachsenen (26-28 Jahre alt; Gewicht 60-91 kg; zwei weiblich, einer männlich) eingenommen. Anschließend wurde über fünf Tage kontinuierlich der Urin in Fraktionen gesammelt, gefolgt von vier Tagen an denen nur der Morgenurin gesammelt wurde.

Die Urinproben wurden mittels Festphasenextraktion (SPE) (selbst hergestellte Kartuschen gefüllt mit Serdolit<sup>®</sup> PAD I, einem Kopolymerisat aus Polystyren und Divinylbenzen (Partikelgröße 0,1 – 0,2 mm)) analog einer Probenvorbereitung von Urinproben zur Analyse auf Diuretika aufgearbeitet.<sup>98,112</sup> Säulen mit einer Betthöhe von ca. 2,7 cm Serdolit PAD I wurden mit 2 mL H<sub>2</sub>O konditioniert und mit 2 mL der Urinprobe bestückt. Nach Zugabe von 20 µL *p*-Hydroxyephedrin-Sulfokonjugatlösung (1 mg/mL) als ISTD wurden die Säulen mit 2 mL H<sub>2</sub>O gewaschen und die Analyten mit 2 mL MeOH eluiert. Nachdem das Eluat unter Vakuum getrocknet wurde, wurden die Proben mit 200 µL einer Mischung von Ammoniumacetatpuffer (5 mM; 1mL/L Eisessig; pH 3,5) / ACN (80:20, v:v) wieder gelöst und mittels LC-MS/MS gemessen. Da für eine umfassende Validierung der Probenvorbereitungsmethode nicht genügend Referenzmaterial des Sulfokonjugates zur Verfügung stand, wurde lediglich für das freie Terbutalin das LOD bestimmt. Für die Quantifizierung von unkonjugiertem Terbutalin wurde eine Kalibriergerade von 0,2 µg/mL bis 10 µg/mL erstellt.

Für die Beobachtung des Ausscheidungsprofils von Terbutalin und seinen Konjugaten in Urinproben wurden die Analyten und der ISTD durch charakteristische Ionenübergänge detektiert: Terbutalin *m/z* 226-152; *mono*-sulfokonjugiertes Terbutalin *m/z* 306-232; glucuronidiertes Terbutalin *m/z* 402-226; *bis*-sulfokonjugiertes Terbutalin *m/z* 386-312 und *m/z* 386-232; *tris*-sulfokonjugiertes Terbutalin *m/z* 466-312; sulfokonjugiertes *p*-Hydroxyephedrin (ISTD) *m/z* 262-164 (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1).

### 3.2.3 Fenoterol

Für die Untersuchung der Ausscheidung von Fenoterol und seinem Sulfokonjugat wurde einem gesunden Erwachsenen (29 Jahre, Gewicht 63 kg, weiblich) zwei Tabletten Fenoterol (je 5 mg des Hydrobromid-Salzes) oral appliziert. Anschließend wurde drei



Tage kontinuierlich Urin gesammelt, und an einem weiteren Tag der Morgenurin. Nach einer Auswaschphase von zwei Wochen ohne Medikamenteneinnahme, wurden in einer weiteren Studie derselben Person zwei Hübe (je 100 µg des Hydrobromid-Salzes) eines Fenoterol-Dosieraerosols appliziert. Anschließend wurde zwei Tage kontinuierlich Urin gesammelt, und an einem weiteren Tag der Morgenurin. Mittels Direktmessung der Urinproben, ohne Probenvorbereitung, wurden die Proben zur Beobachtung eines Ausscheidungsprofils von Fenoterol und seinen Sulfokonjugaten mittels LC-MS/MS gemessen. Dabei wurden die Analyten durch charakteristische Ionenübergänge detektiert (Bedingungen siehe Kapitel 3.4.1): Fenoterol:  $m/z$  304-135; sulfokonjugiertes Fenoterol:  $m/z$  384-135 (durch eine *in source*-Eliminierung einer  $SO_3$ -Gruppe kann auch das *bis*-Sulfokonjugat von Fenoterol durch diesen Ionenübergang detektiert werden).

### 3.3 Screeningprozedur

Um zu überprüfen, ob die Analyse auf Sulfokonjugate von strukturverwandten Sympathomimetika in einer umfassenden Screeningprozedur mittels Direktmessung ohne Probenvorbereitung zusammen mit Diuretika, Narkotika, frei ausgeschiedenen  $\beta_2$ -Agonisten, frei ausgeschiedenen Stimulanzien und weiteren dopingrelevanten Substanzen möglich ist, wurden die Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5**) und Etamivan (**6**) als Beispielsubstanzen benutzt. Diese wurden bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Institut für Biochemie synthetisiert und charakterisiert.<sup>47</sup> Zum Zeitpunkt dieser Studie standen die in dieser Arbeit hergestellten Sulfokonjugate von Octopamin, Etilefrin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

#### 3.3.1 Probenvorbereitung

Ein Aliquot von 90 µL der Urinprobe wurde mit 50 ng ISTD Mefrusid (10 µL einer 5 µg/mL Lösung des ISTD in MeOH) versetzt, die Probe durchmischt und 5 µL in das Gerät injiziert (Bedingungen siehe 3.4.3).

### 3.3.2 Analytik

Die Analyten und der ISTD (Mefrusid) wurden mit MRM-Experimenten der diagnostischen Ionenübergänge (siehe Anhang, Kapitel 7.5, Tabelle 11, ab Seite 154) bei einer *dwell time* von 10 msec detektiert. Für die Optimierung des *orifice potential* und der Kollisionsenergie wurden Lösungen der Referenzsubstanzen mit einer Spritzenpumpe (Flussrate 10 µL/mL) direkt in das System injiziert.

### 3.3.3 Qualitätskontrollproben

Zur Qualitätskontrolle (QC) wurde mit jeder Reihe Urinproben eine QC-Probe aufgearbeitet, die mit Konzentrationen am jeweiligen *Minimum Required Performance Limit* (MRPL) der Analyten, mit Ausnahme der Diuretika (125 ng/mL), versetzt war. Das MRPL sind Nachweisgrenzen, die ein Nachweisverfahren mindestens erfüllen muss, um für die Analyse von Dopingkontrollproben angewendet zu werden (Stand Technisches Dokument „WADA Technical Document TD2010MRPL“).<sup>113</sup> Dabei wurde für die Stimulanzien und deren Sulfokonjugate eine Konzentration von 500 ng/mL, für die  $\beta_2$ -Agonisten 100 ng/mL und für die Narkotika 200 ng/mL (Ausnahme Fentanyl 10 ng/mL) eingesetzt.

### 3.3.4 Validierung der Methode

Als Validierungsparameter wurden die Spezifität, die Ionensuppression, die *Intra*- und *Interday*-Präzision, das LOD und die Robustheit untersucht. Die Validierung für die Identifizierung von Analyten wurde nach den Richtlinien der *International Conference on Harmonisation* und der WADA durchgeführt.<sup>114,115</sup> Alle Proben wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben vorbereitet.

#### 3.3.4.1 Spezifität

Zur Untersuchung der Spezifität wurden sechs verschiedene Blankurine und sechs verschiedene mit den Analyten versetzte Urine (5 weibliche und 1 männlicher Proband) mittels der in 3.4.3 Kapitel beschriebene Methode analysiert und auf interferierende Signale in den entsprechenden MRM-Chromatogrammen zu den erwarteten Retentionszeiten der Analyten untersucht.

### 3.3.4.2 Ionensuppression/ Ionenverstärkung

Das Ausmaß der Ionensuppression oder Ionenverstärkung wurde untersucht, indem eine Mischung der Referenzsubstanzen (1 µg/mL) mittels Dauerinfusion (20 µL/min) durch eine Spritzenpumpe über ein T-Stück der Ionenquelle zugeführt wurde. Gleichzeitig wurden dem chromatografischen Lauf verschiedene Blankurinproben (insgesamt sechs verschiedene) zugeführt.<sup>116</sup> So kann untersucht werden, ob das Signal der Analyten durch die hinzugefügte Matrix supprimiert oder verstärkt wird.

### 3.3.4.3 Präzision

Die *Intraday*-Präzision wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen für jede Referenzsubstanz ermittelt (QC<sub>niedrig</sub>, QC<sub>mittel</sub>, QC<sub>hoch</sub>). Sechs Urinproben wurden mit den Referenzsubstanzen versetzt und mit der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Methode analysiert (Konzentrationen der Analyten siehe Anhang, Kapitel 7.4, Tabelle 11, ab Seite 154). Die entsprechende *Interday*-Präzision wurde ermittelt, indem die Urinproben an drei unterschiedlichen Tagen vorbereitet und gemessen wurden. Die Präzision der Methode wurde berechnet, indem der Variationskoeffizient (CV) des Flächenverhältnisses der Analyten zum ISTD gebildet wurde.

### 3.3.4.4 Nachweisgrenze

Das LOD wurde definiert als niedrigste Konzentration bei der das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) der jeweiligen Ionenspuren  $\geq 3$  ist. Es wurde ermittelt, indem zehn Blank-Urinproben und zehn Urinproben mit 25 µg/mL der Sulfokonjugate der Stimulanzien, 10 und 100 ng/mL der freien Stimulanzien, 5 und 50 ng/mL der Diuretika und 5 ng/mL der  $\beta_2$ -Agonisten und Narkotika versetzt gemessen wurden.

### 3.3.4.5 Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde durch den Vergleich der relativen Retentionszeiten der Analyten der QC-Proben innerhalb eines Monats ermittelt (berechnet als Variationskoeffizient).

### 3.3.5 Anwendung auf Urinproben

Offizielle Dopingkontrollproben, die positiv für Amphetamin oder Methamphetamin getestet wurden, wurden auf die Sulfokonjugate von **4 (4-Sulf)** und **5 (5-Sulf)** untersucht. Ein Etamivan-Referenzurin der von der WADA erhalten wurde, wurde auf Etamivan-Sulfokonjugat (**6-Sulf**) analysiert.

### 3.4 Messmethodik

#### 3.4.1 LC-MS/MS System I

**Flüssigkeitchromatographie:** **Agilent 1200 Series LC**

Säule Gemini C<sub>6</sub>-Phenyl  
(Phenomenex<sup>®</sup>, 150 x 4,6 mm; Partikelgröße 3 µM)

Mobile Phase A: Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5),  
1 mL/L Eisessig  
B: ACN

Gradient 0:00 min → 1:00 min 100 % A  
  
1:00 min → 8:00 min 0 % A  
  
8:01 min → 12:30 min 100 % A

Fenoterol-Versuche:

0:00 min → 1:00 min 100 % A  
  
1:00 min → 8:00 min 30 % A  
  
8:01 min → 9:00 min 0 % A  
  
9:01 min → 13:30 min 100 % A

Flussrate 0,8 mL/min

Injektionsvolumen 10 µl (Fenoterol-Versuche 5 µL)

**Massenspektrometrie:** **API 4000 QTRAP<sup>®</sup>**

Ionisierung ESI, negativ (Etilefrin) oder positiv (Etilefrin, Terbutalin, Fenoterol)

Ionisierungsspannung 5500 V (positiv); -4500 V (negativ)

Interface Temperatur 450 °C

Kollisionsgas Stickstoff

### 3.4.2 LC-MS/MS System II

**Flüssigkeitchromatographie:**      **Agilent 1260 Infinity Series LC**

Säule      Gemini C<sub>6</sub>-Phenyl  
(Phenomenex<sup>®</sup>, 150 x 4,6 mm; Partikelgröße 3 µm)

Mobile Phase      A: Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5),  
1 mL/L Eisessig  
B: ACN

Gradient      0:00 min → 1:00 min 100 % A  
  
1:00 min → 8:00 min 0 % A  
  
8:01 min → 12:30 min 100 % A

Fenoterol-Versuche:

0:00 min → 1:00 min 100 % A  
  
1:00 min → 8:00 min 30 % A  
  
8:01 min → 9:00 min 0 % A  
  
9:01 min → 16:30 min 100 % A

Flussrate      0,8 mL/min

Injektionsvolumen      20 µl, Fenoterol-Versuche: 5 µL

**Massenspektrometrie:**      **AB Sciex QTRAP<sup>®</sup> 5500**

Ionisierung      ESI, positiv

Ionisierungsspannung      5500 V

Interface Temperatur      475 °C, Fenoterol-Versuche: 450 °C

Kollisionsgas      Stickstoff

### 3.4.3 LC-MS/MS System III

<b>Flüssigkeitchromatographie:</b>	<b>Agilent 1260 Infinity Series LC</b>
Säule	Nucleodur C <sub>18</sub> Pyramid (2 x 50 mm, 3 µm Partikelgröße; Macherey Nagel)
Vorsäule	Gemini C <sub>6</sub> -Phenyl (4 x 2 mm, Phenomenex®)
Mobile Phase	A: Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5), 1 mL/L Eisessig B: ACN
Gradient	0:00 min → 4:30 min 100 % A → 10 % A  4:31 min → 13:30 min 100 % A  13:31 min → 13:45 min 100 % A
Flussrate	0,35 mL/min; 4:31 min bis 13:30 min 0,5 mL/min
Injektionsvolumen	5 µl
<b>Massenspektrometrie:</b>	<b>AB Sciex QTRAP® 5500</b>
Ionisierung	ESI, positiv und negativ
Ionisierungsspannung	5500 V (positiv); -4500 V (negativ)
Interface Temperatur	450 °C
Kollisionsgas	Stickstoff

### 3.4.4 Präparatives LC-UV System

System	Knauer Smartline: HPLC Pump 1800 UV Detector 2600 Smartline Autosampler 3950 Fraktionssammler: Foxy R1 (Teledyne Isco)
Säule	Gemini C <sub>6</sub> -Phenyl (Phenomenex <sup>®</sup> , 250 x10 mm; Partikelgröße 5 µm)
Flussrate	5 mL/min
Wellenlänge	278 nm
Mobile Phase	<u>Octopamin-Sulfokonjugat-Aufreinigung:</u>  100 % Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5),  1 mL/L Eisessig  Laufzeit: 15:00 min  <u>Fenoterol-Sulfokonjugat-Aufreinigung und Salbutamol-Sulfokonjugat-Aufreinigung:</u>  A: Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5; 1 mL/L Eisessig); B: ACN  0:00 min → 2:30 min 100 % A  2:30 min → 16:00 min 57 % A  16:01 min → 17:00 min 0 % A  17:01 min → 20:00 min 100 % A



### 3.4.5 LTQ-Orbitrap™-Hybridmassenspektrometer

Zur HRMS-Charakterisierung wurden die Analyten in ACN/H<sub>2</sub>O (1:1) mit 2 % Essigsäure gelöst, so dass sich eine Konzentration von 10 µg/mL der Analyten ergab. Die Lösung wurde anschließend mit einer Spritzenpumpe bei einer Fließrate von 5 µL/min in das Massenspektrometer eingeleitet.

<b>Massenspektrometrie:</b>	<b>Thermo LTQ Orbitrap™</b>
Ionisierung	positiv, ESI
Ionisierungsspannung	4000 V
Kapillartemperatur	290 °C
Auflösung	50000
Kollisionsenergie	15-25 au
Kollisionsgas	Helium
<i>Damping</i> -Gas LTQ	Helium
<i>Damping</i> -Gas C-Trap	Stickstoff

### 3.4.6 LC-Quadrupol/ Orbitrap-Massenspektrometer

Zur HRMS-Charakterisierung wurden die Analyten in ACN/H<sub>2</sub>O (1:1) mit 2 % Essigsäure gelöst, so dass sich etwa eine Konzentration von 10 µg/mL der Analyten ergab. Dabei wurden *full scan* Experimente (*m/z* 100-1000) und MS<sup>2</sup>-Experimente durchgeführt.

#### Flüssigkeitchromatographie: Thermo Accela 1250

Säule	Nucleodur Pyramid C <sub>18</sub> (2.0×50 mm, 1,8 µm Partikelgröße, Macherey Nagel)
Vorsäule	Nucleodur Pyramid C <sub>18</sub> (2.0×4 mm, 3 µm Partikelgröße, Macherey Nagel)
Mobile Phase	A: Ammoniumacetat-Puffer (5 mM; pH 3,5), 1 mL/L Eisessig B: ACN
Gradient	0:00 min → 7:00 min 100 % A → 0 % A  7:01 min → 12:00 min 100 % A
Flussrate	200 µL/min
Injektionsvolumen	10 µL

#### Massenspektrometrie: Thermo Q Exactive

Ionisierung	positiv, HESI
Ionisierungsspannung	4000 V
Interface Temperatur	350 °C
Kapillartemperatur	320 °C
Kollisionsgas	Stickstoff
Auflösung	<i>full scan</i> ( <i>m/z</i> 100-1000): 35000 (FWHM) MS <sup>2</sup> : 17500 (FWHM)

### 3.4.7 NMR-Charakterisierung

Die Bestätigung der Strukturen der Referenzsubstanzen von Terbutalin-Sulfokonjugat und Octopamin-Sulfokonjugat erfolgte mittels NMR-Spektroskopie auf einem Bruker Avance DRX 500-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) bei 303 K.  $^1\text{H}$ -NMR- (500 MHz) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren (125 MHz) wurden sowohl von den sulfokonjugierten Produkten, als auch von den entsprechenden Aglyka aufgenommen. Chemische Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm angegeben und beziehen sich auf die Signalmitte des Lösungsmittelpeaks: DMSO- $d_6$  2,49 ppm (Terbutalin und Terbutalin-Sulfokonjugat) und  $\text{D}_2\text{O}$  4,78 ppm (Octopamin und Octopamin-Sulfokonjugat). Um Die Multiplizitäten zu charakterisieren, wurden folgende Abkürzungen benutzt: *s*, Singulett; *d*, Dublett; *t*, Triplett; *m*, Multiplett. Für die Aufnahme von NMR-Spektren der Sulfokonjugate von Fenoterol und Salbutamol konnte nicht ausreichend Referenzmaterial gewonnen werden.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese von Referenzverbindungen

#### 4.1.1 Untersuchung verschiedener Sulfonierungsreagenzien in Reaktion mit Etilefrin

Bei der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Untersuchung des Reaktionsverlaufs der Synthese der Sulfokonjugate von Etilefrin (Produktionen-Massenspektrum siehe Abbildung 14 und Abbildung 15) unter variierenden Reaktionsbedingungen führte zu zwei verschiedenen *mono*-Sulfokonjugaten (**1-Sulf1** und **1-Sulf2**) (Produktionen-Massenspektren siehe Abbildung 16 bis Abbildung 19) und einem *bis*-Sulfokonjugat (**1-Sulf3**) (Produktionen-Massenspektren siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). In Tabelle 1 ist die Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von Etilefrin (**1**), dem *mono*-Sulfokonjugat **1-Sulf1** sowie des *bis*-Sulfokonjugates **1-Sulf3** und die resultierenden Produktionen, ermittelt durch hochaufgelöste, massengenaue MS-Experimente (17500 FWHM), zusammengefasst. Anhand dieser Daten und mit Hilfe der Produktionen-Massenspektren wird im Folgenden die Strukturcharakterisierung der Sulfokonjugate von Etilefrin beschrieben.

Im Produktionen-Massenspektrum von **1** im negativen Messmodus (Abbildung 14) führt die Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 Da) vom Quasimolekülion ( $m/z$  180) zur Produktion  $m/z$  162 mit geringer Intensität. Die weitere Eliminierung der N-Methyl-ethylamingruppe führt zur Produktion  $m/z$  121 mit hoher Intensität. Das Produktion  $m/z$  93 entspricht dem deprotonierten Phenolrest. Im positiven Messmodus (Abbildung 15) führt die Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 Da) vom Quasimolekülion  $m/z$  182 zur Produktion  $m/z$  164 mit hoher Intensität. Die anschließende Eliminierung des Ethyl-Restes führt zur Produktion  $m/z$  135. Die Abspaltung von H<sub>2</sub>O (-18 Da) und des Ethylamin-Restes vom Quasimolekülion führt zu dem Produktion  $m/z$  121.

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1 Elementare Zusammensetzung und resultierende Produktionen der protonierten Moleküle von Etilefrin und seine Sulfokonjugaten ermittelt durch HRMS-Experimente ( $MS^2$ , LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS)

Verbindung	Vorläufer-ion ( $m/z$ )	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	CE (eV)	Produktion ( $m/z$ )	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	Abspaltung
Etilefrin ( <b>1</b> ; RT 2,53 min)	182,1173	$C_{10}H_{16}O_2N$	-1,7	10	164,1066	$C_{10}H_{14}ON$	-2,3	$H_2O$
					135,0677	$C_8H_9ON$	-1,0	$H_2O, C_2H_5$
					121,0649	$C_8H_9O$	0,1	$H_2O, C_2H_5N$
					109,0649	$C_7H_9O$	1,3	$H_2O, C_3H_5N$
					91,0545	$C_7H_7$	3,1	$H_2O, C_3H_7ON$
Etilefrin- <i>mono</i> -Sulfokonjugat ( <b>1-Sulf1</b> ; RT 3,02 min)	262,0741	$C_{10}H_{16}O_5NS$	-1,1	10	244,0634	$C_{10}H_{14}O_4NS$	-1,8	$H_2O$
					182,1174	$C_{10}H_{16}O_2N$	-0,6	$SO_3$
					164,1068	$C_{10}H_{14}ON$	-1,4	$H_2O, SO_3$
					135,0677	$C_8H_9ON$	-1,5	$H_2O, SO_3, C_2H_5$
Etilefrin- <i>bis</i> -Sulfokonjugat ( <b>1-Sulf3</b> ; RT 2,98 min)	342,0309	$C_{10}H_{16}O_8NS_2$	-0,9	14	262,0739	$C_{10}H_{16}O_5NS$	-1,9	$SO_3$
					244,0633	$C_{10}H_{14}O_4NS$	-2,0	$H_2O, SO_3$
					182,1173	$C_{10}H_{16}O_2N$	-1,2	$2 \times SO_3$
					164,1067	$C_{10}H_{14}ON$	-1,5	$H_2O, 2 \times SO_3$

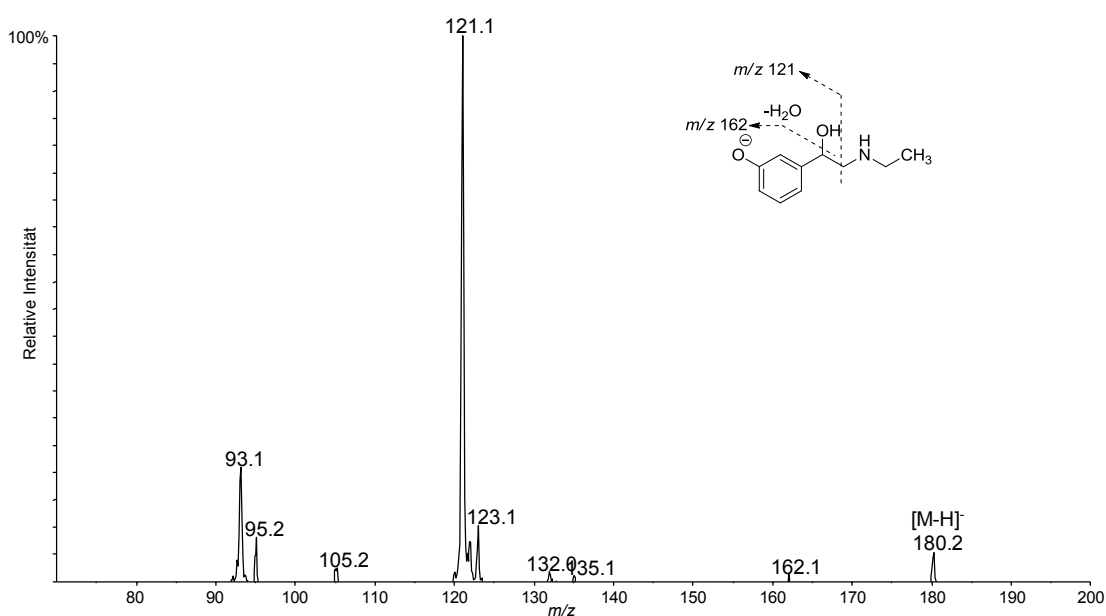


Abbildung 14 Produktionspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküls  $[M-H]^-$  von Etilefrin (**1**, RT 4,22 min; CE -30 eV)

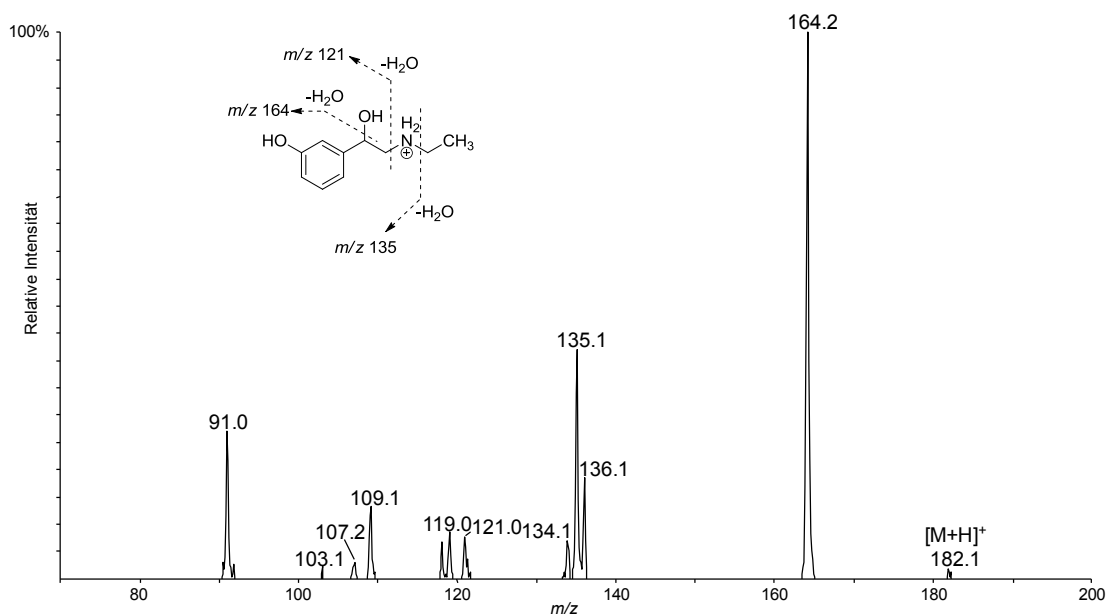


Abbildung 15 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Etilefrin (**1**, RT 4,22 min; CE 30 eV)

Abbildung 16 und Abbildung 18 zeigen die Produktionen-Massenspektren der *mono*-Sulfokonjugate **1-Sulf1** und **1-Sulf2** im negativen Messmodus. Die Abspaltung von  $\text{SO}_3$  (80 Da) vom Quasimolekülion  $m/z$  260 führt zur Produktion  $m/z$  180. Diese Eliminierung weist bei **1-Sulf1** eine hohe Intensität auf, während diese Produktion bei **1-Sulf2** nur geringe Intensität besitzt. Das Hauptfragment  $m/z$  97 im Produktionen-Massenspektrum von **1-Sulf2** entspricht  $\text{HSO}_4^-$  und  $m/z$  80 entspricht  $\text{SO}_3^-$ .<sup>73,82</sup> Abbildung 17 und Abbildung 19 zeigen die Produktionenspektren von **1-Sulf1** und **1-Sulf2** im positiven Messmodus. Das Quasimolekülion von **1-Sulf1**  $m/z$  262 spaltet  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) ab, was zur Produktion  $m/z$  244 führt. Die Eliminierung von  $\text{SO}_3$  (-80 Da) führt zur Produktion  $m/z$  182. Die zusätzliche Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) führt zum Hauptfragment  $m/z$  164. Im Produktionen-Massenspektrum von **1-Sulf2** führt die Eliminierung von 98 Da ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) zum Hauptfragment  $m/z$  164. Im Produktionen-Massenspektrum von **1-Sulf1** deutet die Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  auf eine freie alkyliche Hydroxyfunktion hin.<sup>117,118</sup> Da das Produktionen-Massenspektrum von **1-Sulf2** keine  $\text{H}_2\text{O}$ -Eliminierung aufweist, bedeutet dies, dass bei **1-Sulf1** der Sulfatester an der phenolischen Gruppe lokalisiert ist und bei **1-Sulf2** an der alkylichen Hydroxygruppe.

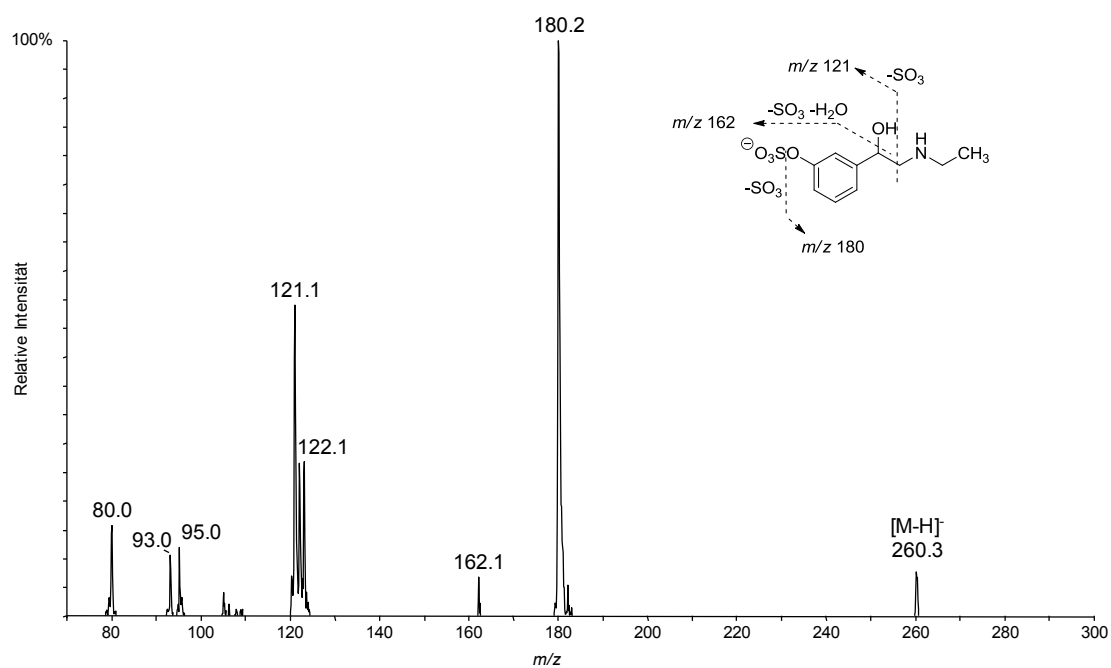


Abbildung 16 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat 1 (**1-Sulf1**, RT 6,11 min; CE -35 eV)

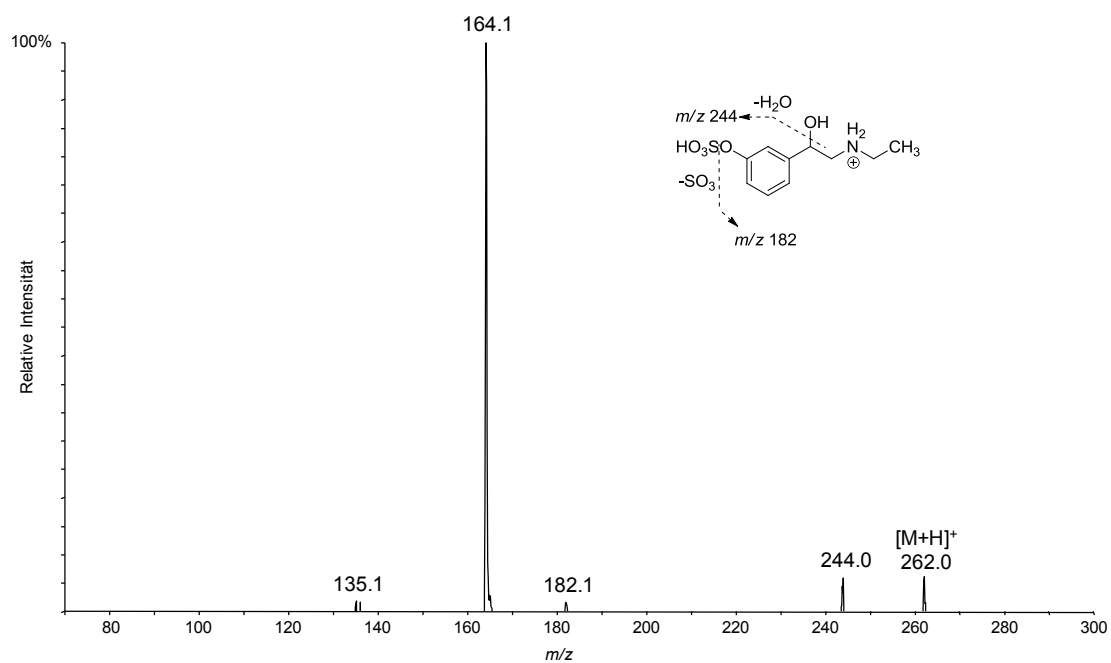


Abbildung 17 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat 1 (**1-Sulf1**, RT 6,11 min; CE 25 eV)



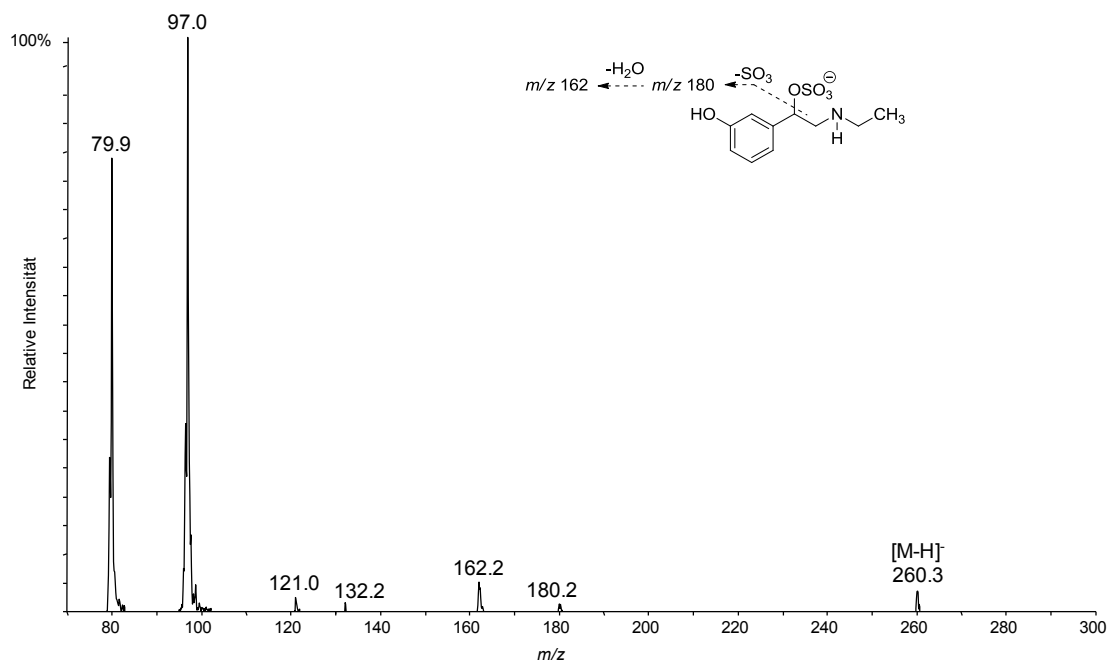


Abbildung 18 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat 2 (**1-Sulf2**, RT 6,34 min; CE -35 eV)

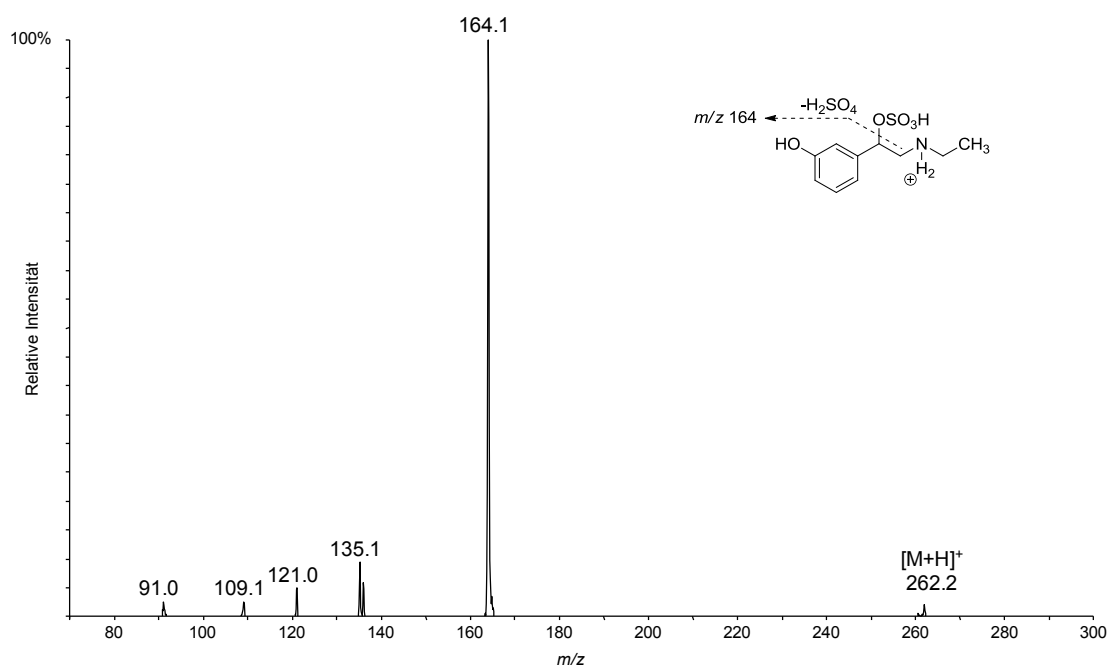


Abbildung 19 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat 2 (**1-Sulf2**, RT 6,34 min; CE 25 eV)

Das Produktionen-Massenspektrum von **1-Sulf3** (Abbildung 20, negativer Messmodus) weist zwei Mal eine Eliminierung von 80 Da ( $SO_3$ ) auf, durch die die Produktionen

$m/z$  260 und  $m/z$  180 generiert werden. Die Abspaltung von 98 Da ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) aus dem Quasimolekülion führt zur Produktion  $m/z$  242. Abbildung 21 zeigt das Produktions-Massenspektrum von **1-Sulf3** im positiven Messmodus. Dort wird durch die Eliminierung von 98 Da ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) das Hauptfragment  $m/z$  244 generiert. Das Produktions  $m/z$  164 entsteht durch die Abspaltung von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (-98 Da) und  $\text{SO}_3$  (-80 Da) vom Quasimolekülion.

Mit Hilfe der Produktions-Massenspektren und der HRMS-Experimente können die in Abbildung 13 (Kapitel 3.1.3) beschriebenen Produkte in ihrer Struktur bestätigt werden. Bei **1-Sulf1** handelt es sich um phenolisch konjugiertes Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat, **1-Sulf2** ist an der benzylichen Hydroxygruppe einfach verestert und **1-Sulf3** stellt das *bis*-Sulfokonjugat von Etilefrin dar und ist an beiden Hydroxygruppen verestert. Die Retentionszeiten der Sulfokonjugate am *reversed phase*-Material der C6-Phenyl-Säule (Gemini® C6 Phenyl, Phenomenex®) nehmen mit zunehmender Polarität zu. Am *reversed phase*-Material konnte aufgrund der Polarität der Sulfokonjugate eine längere Retention mit abnehmender Polarität angenommen werden. Die unerwartete Elutionsreihenfolge der Analyten ist mit dem gewählten Puffer-System (Ammoniumacetat-Puffer) erklärbar. Dabei ist eine Ionenpaarbildung der Sulfokonjugate (deprotoniert vorliegend) mit den  $\text{NH}_4^+$ -Ionen des Puffers möglich. Aus diesem Grund können die sehr polaren, geladenen Sulfokonjugate besser am Säulenmaterial retinieren und weisen eine spätere Retentionszeit im Vergleich zum freien Etilefrin (**1**) auf. Die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen des Säulenmaterials mit den Analyten liefern darüber hinaus gute Retention von aromatischen Verbindungen.

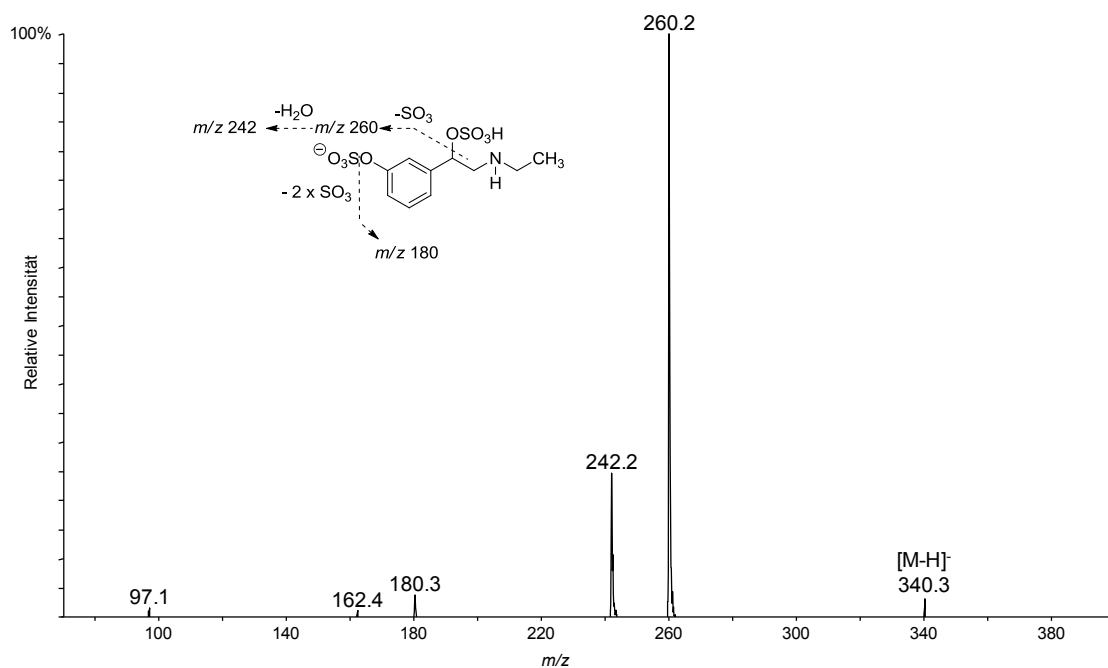


Abbildung 20 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von Etilefrin-*bis*-Sulfokonjugat (**1-Sulf3**, RT 8,59 min; CE -25 eV)

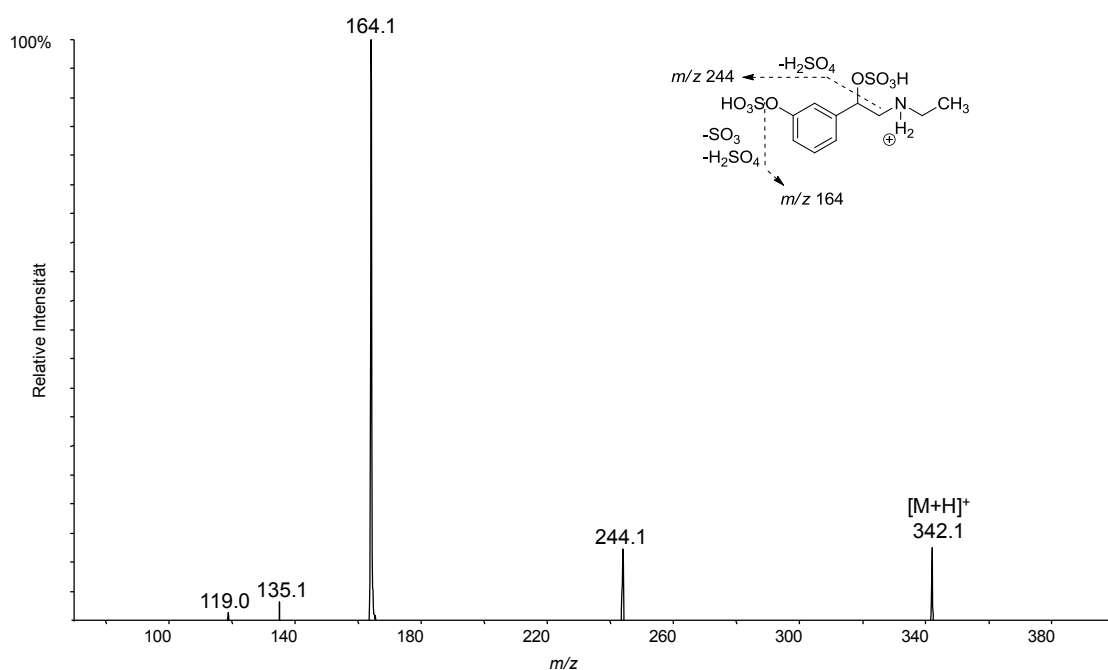


Abbildung 21 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*bis*-Sulfokonjugat (**1-Sulf3**, RT 8,59 min; CE 30 eV)

#### 4.1.1.1 Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe

Bei der Untersuchung der beiden Schwefeltrioxid-Amin-Komplexe Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex und Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex (siehe Kapitel 3.1.1.1) zur Synthese mit Etilefrin (**1**) konnte keine Selektivität oder Präferenz für die Bildung eines Sulfokonjugates beobachtet werden. Sowohl der Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex, als auch der Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zeigte sich unselektiv gegenüber der Sulfonierungsposition. Bei der Umsetzung von **1** entsteht bei beiden Edukten sowohl ein Sulfokonjugat, welches an der Phenolgruppe verestert ist (**1-Sulf1**), als auch ein Sulfokonjugat, das an der benzyllischen Hydroxygruppe verestert ist (**1-Sulf2**). In Abbildung 22 und Abbildung 23 ist der Anteil der beiden möglichen *mono*-Sulfokonjugate zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Synthese abgebildet. Die Bildung des benzyllischen Sulfokonjugates bleibt bei beiden Sulfonierungsreagenzien relativ konstant. Lediglich nach 8 h ist die Signalintensität für dieses Produkt nach der Reaktion von Etilefrin mit Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex erniedrigt. Die Bildung eines benzyllischen Sulfokonjugates ist tendenziell geringer, wenn Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex als Reaktionspartner benutzt wurde. Zunehmende Reaktionsdauer ist nachteilig für die Bildung von phenolisch sulfokonjugiertem Etilefrin. Bei der Betrachtung der Reaktion von Etilefrin zu den verschiedenen Sulfokonjugaten muss beachtet werden, dass eine Quantifizierung der Konjugate aufgrund von fehlendem Referenzmaterial nicht möglich war. Deshalb wurde die Signalflächenintensität der EPI-Experimente benutzt um die Menge der jeweiligen Sulfokonjugate im Verlauf zu vergleichen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Ionisationseffektivität für die beiden Sulfokonjugate unterschiedlich sein kann. Deshalb diene dieses Experiment lediglich einer ungefähren Abschätzung des Reaktionsverlaufs der Umsetzung von Etilefrin mit den Schwefeltrioxid-Amin-Komplexen zu den einzelnen Sulfokonjugaten. Ein absoluter Vergleich der Sulfokonjugate ist so nicht möglich. Eine Präferenz eines Sulfonierungs-Eduktes zur Bildung eines bestimmten Sulfokonjugates von Etilefrin lässt sich nicht erkennen.

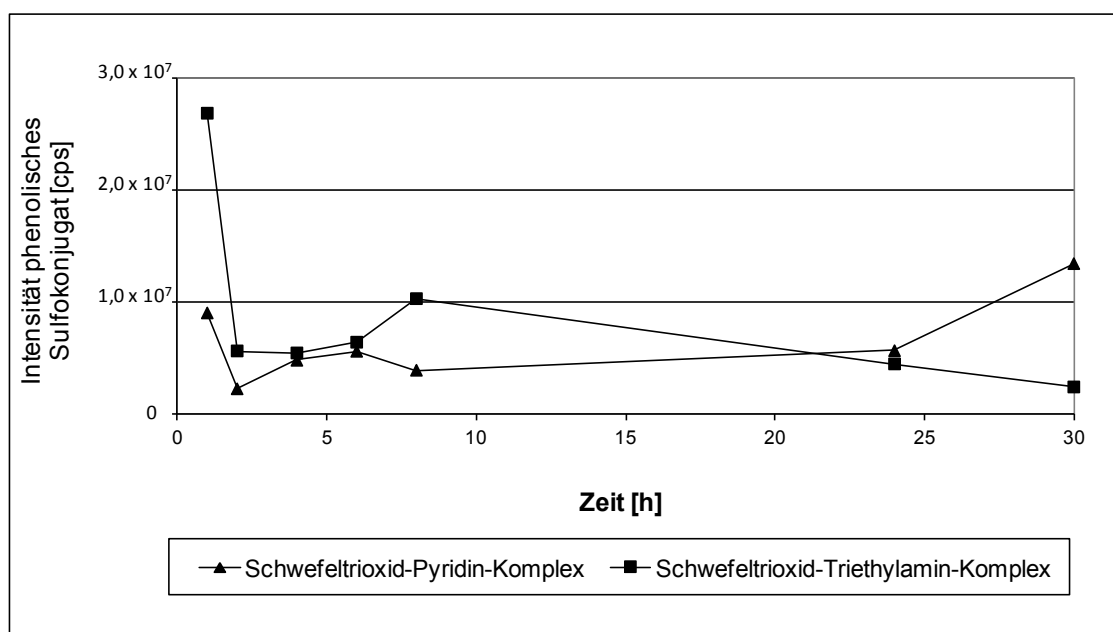


Abbildung 22 Vergleich der Sulfonierungsreagenzien: Bildung von phenolisch konjugiertem Sulfokongugat von Etilefrin (**1-Sulf1**)

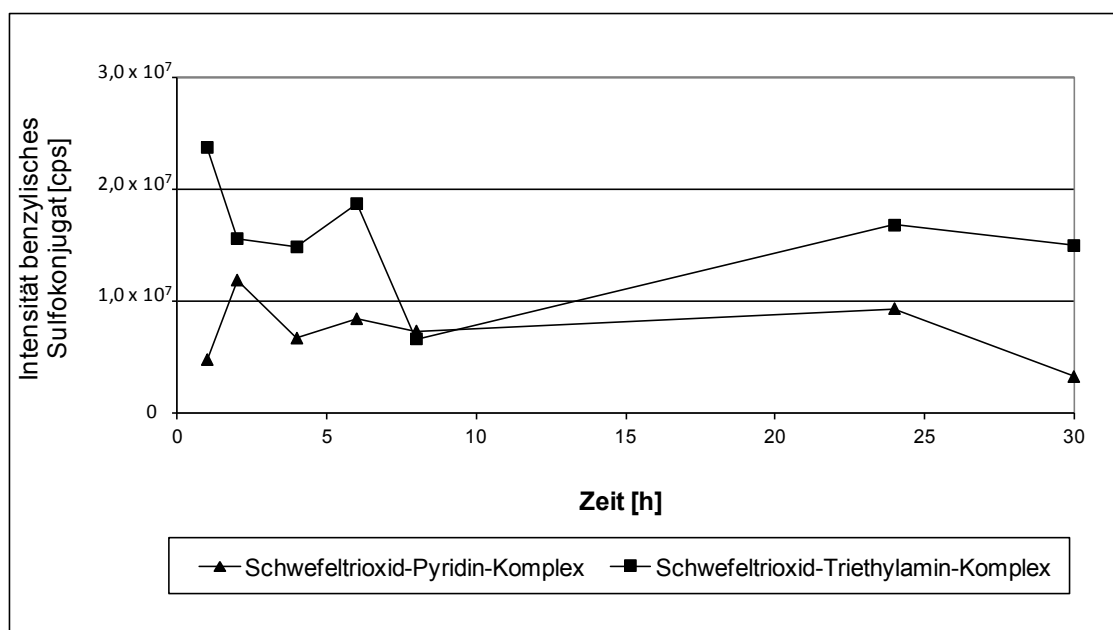


Abbildung 23 Vergleich der Sulfonierungsreagenzien: Bildung von benzylich konjugiertem Sulfokongugat von Etilefrin (**1-Sulf2**)

## 4.1.1.2 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat

Die Umsetzung von Trichlorethanol mit Sulfurylchlorid (siehe Kapitel 3.1.1.2) führte zum Ester 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat. Nach der Reaktion mit **1** und anschließender Reaktion mit aktiviertem Zinkstaub, konnte keine bevorzugte Sulfonierungsposition beobachtet werden. Beide Sulfokonjugate **1-Sulf1** und **1-Sulf2** sind bei der Umsetzung entstanden (siehe Abbildung 24). Das Verhältnis der beiden *mono*-Sulfokonjugate war annähernd gleich wie bei der Umsetzung von **1** mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex.

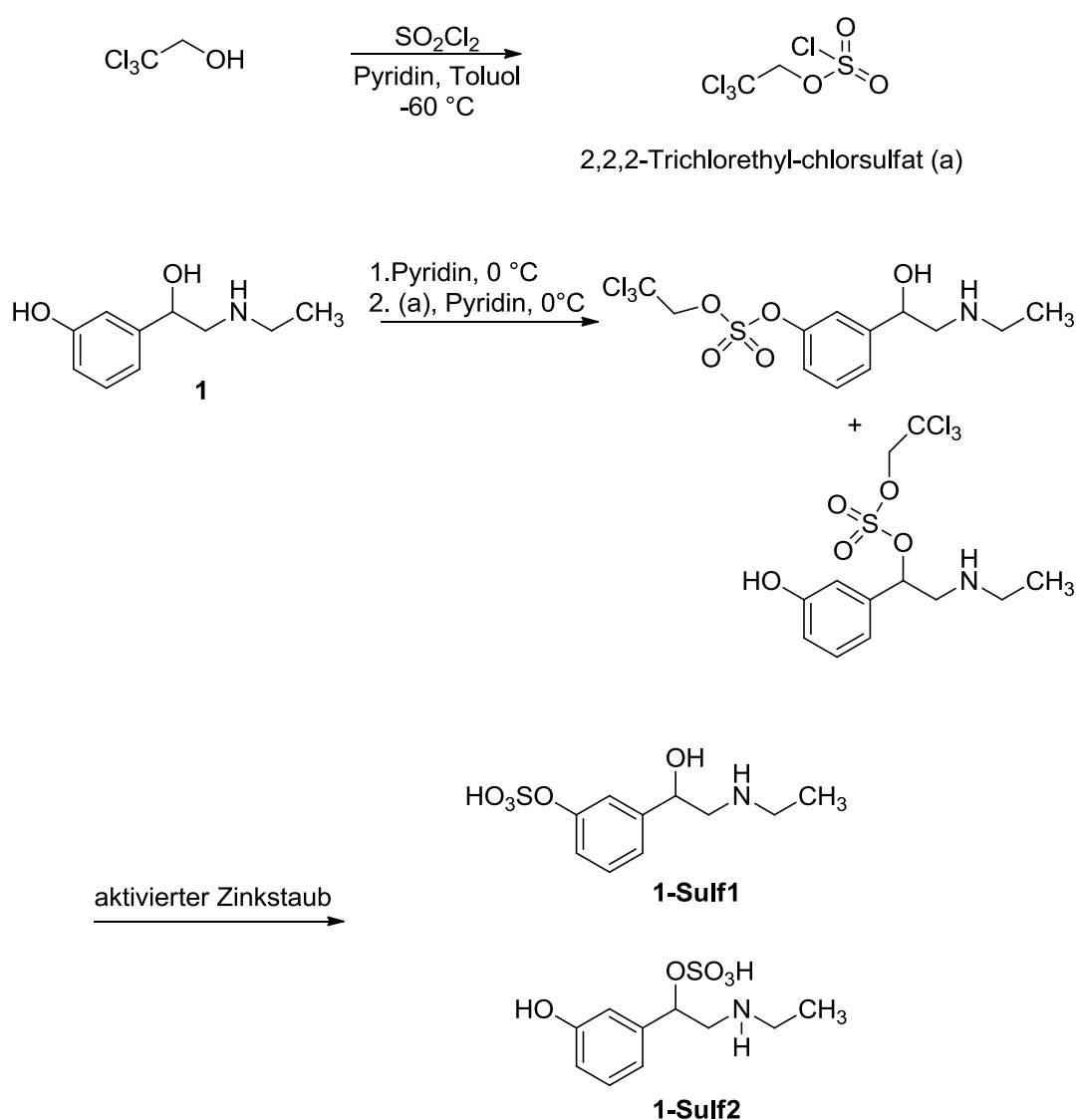


Abbildung 24 Herstellung von 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat (a) und dessen Reaktion mit Etilefrin (**1**) zu **1-Sulf1** und **1-Sulf2**

Bei der Betrachtung der Reaktion von **1** mit 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat zu den verschiedenen Sulfokonjugaten muss, wie auch bei den Experimenten mit den Schwefeltrioxid-Amin-Komplexen (siehe Kapitel 4.1.1.1), beachtet werden, dass eine Quantifizierung der Konjugate nicht möglich war, da kein Referenzmaterial vorhanden war. Es wurde die Signalfächenintensität der EPI-Experimente benutzt, um die Menge der jeweiligen Sulfokonjugate im Verlauf zu vergleichen. Auch hier muss von einer unterschiedlichen Ionisationseffektivität der beiden Sulfokonjugate ausgegangen werden. So wurde das Experiment zu einer Abschätzung des Reaktionsverlaufs der Umsetzung von Etilefrin (**1**) mit 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat zu den einzelnen Sulfokonjugaten benutzt.

#### 4.1.2 Untersuchungen zu einer möglichen selektiven Synthese des phenolisch veresterten Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugates

##### 4.1.2.1 Dimethyloxazolidin-Derivat

Sekundäre Aminoalkohole können mit Carbonyl-Verbindungen zu Oxazolidinen reagieren. Die Reaktion von primären  $\beta$ -Aminoalkoholen mit Carbonylverbindungen führt zu einem tautomeren System zwischen dem Oxazolidin und der entsprechenden Schiff'schen Base.<sup>119,120</sup> Die Kondensation von **1** und Aceton mit Hilfe von  $\text{CaC}_2$  (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.2.1) führte zu einem Produkt mit dem Molekulargewicht von 221 Da (**13**,  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  222). Die Reaktion lief nicht vollständig ab und eine Restmenge an **1** wurde noch im Reaktionsansatz nachgewiesen; diese konnte jedoch durch Extraktion des in  $\text{H}_2\text{O}$  gelösten Ansatzes mit TBME verringert werden. Abbildung 25 zeigt das Produktions-Massenspektrum des Quasimoleküls  $m/z$  222 von **13** im positiven Messmodus. Das Produktions  $m/z$  204 entspricht einer Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da). Aufgrund dieser Eliminierung kann man davon ausgehen, dass die alkyliche Hydroxyfunktion frei vorliegt, kein Ringschluss stattgefunden hat und der sekundäre substituierte Stickstoff von **1** mit Aceton unter Bildung des Enamins N-Isopropenyl-Etilefrin reagiert hat (Abbildung 26).

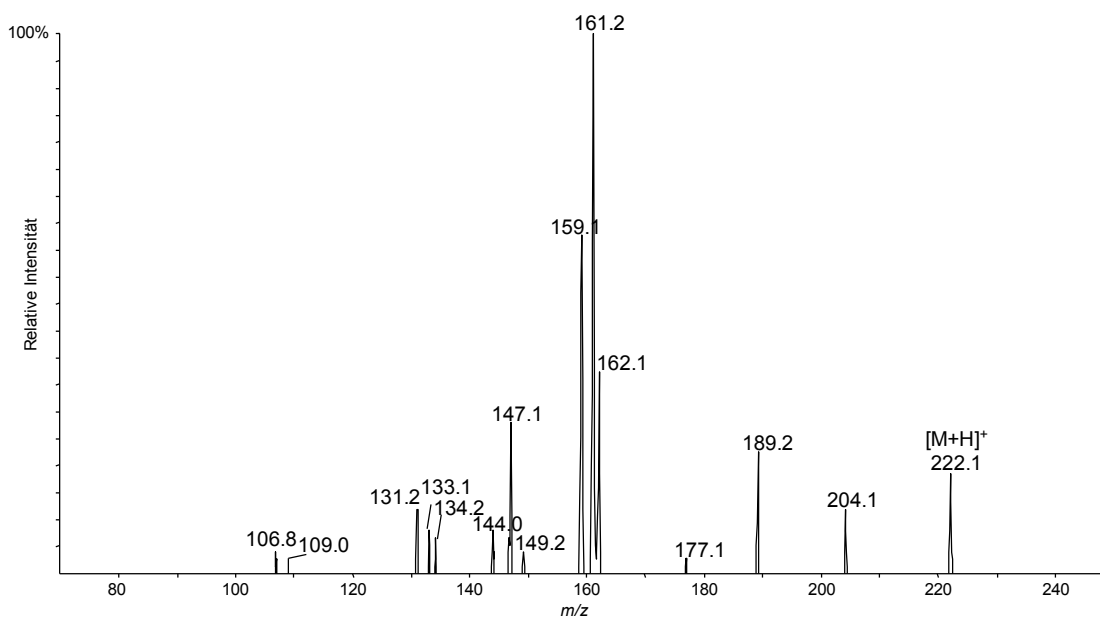


Abbildung 25 Produktionspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  des Kondensationsproduktes **13** (RT 5,79 min; CE 30 eV)

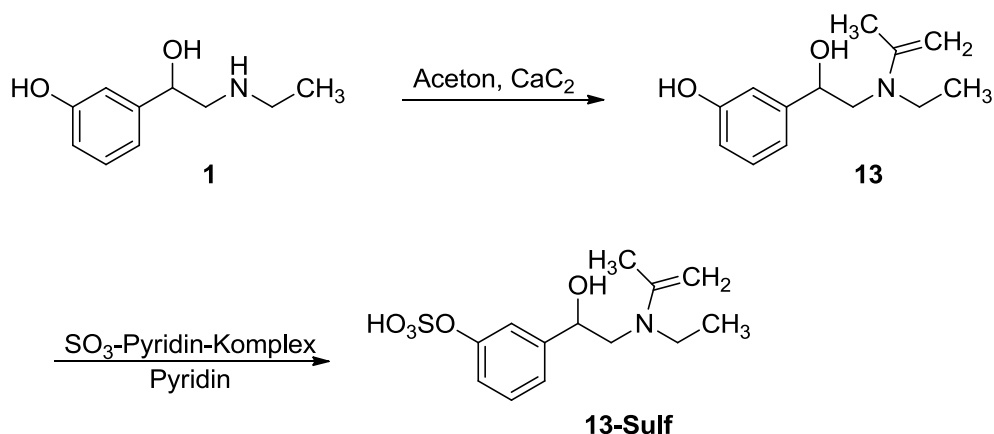


Abbildung 26 Kondensation von Etilefrin (**1**) und Aceton zum Enamin-Derivat von Etilefrin (**13**) und dessen Umsetzung zum Sulfokonjugat **13-Sulf**

Auch wenn das Produktions-Massenspektrum von **13** dafür spricht, dass die Kondensation von **1** mit Aceton nicht zum gewünschten Dimethyloxazolidin-Derivat geführt hat, konnte nach Umsetzung mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex nur ein Sulfokonjugat detektiert werden (siehe Ionenchromatogramm Abbildung 27). Die anschließende Aufreinigung des Sulfonierungsprodukts (**13-Sulf**) von **13** und **1** erwies sich als komplex. Zwei Aufreinigungsschritte mittels Flash-Chromatographie erbrachte eine geringe Menge von **13-Sulf**. Abbildung 28 zeigt das Produktions-Massenspektrum des Quasimoleküls von **13-Sulf** im positiven Messmodus. Auch hier ist eine



Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) mit geringer Intensität zu beobachten, was dafür spricht, dass die phenolische Gruppe sulfokonjugiert ist. Das Produktion  $m/z$  222 wird durch die Abspaltung der  $\text{SO}_3$ -Gruppe (-80 Da) generiert. Die weitere Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) führt zum Produktion  $m/z$  204.

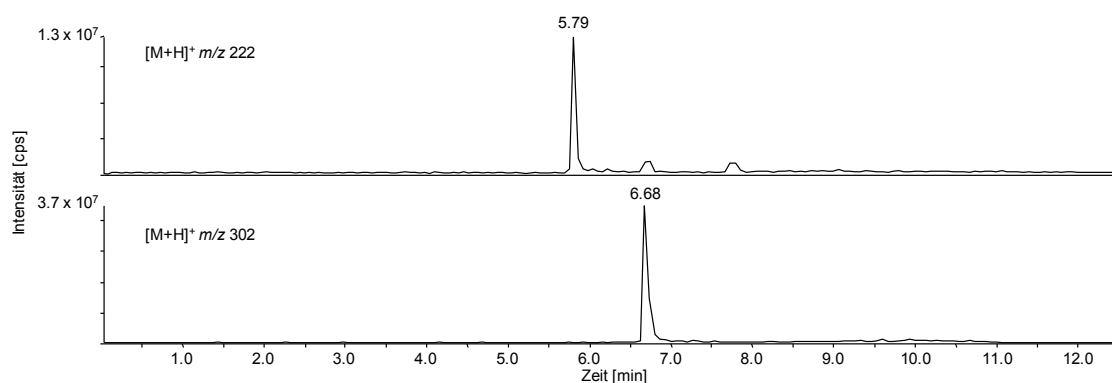


Abbildung 27 Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Quasimoleküle  $[\text{M}+\text{H}]^+ 222$  (**13**) und  $[\text{M}+\text{H}]^+ 302$  (**13-Sulf**)

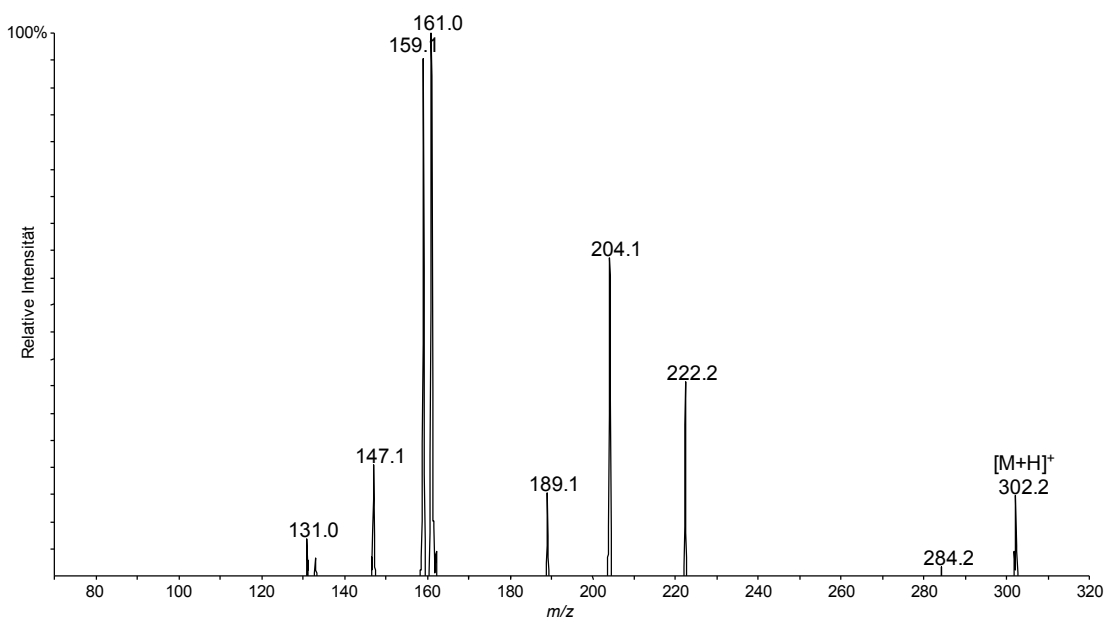


Abbildung 28 Produktionsspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[\text{M}+\text{H}]^+$  des sulfokonjugierten Kondensationsproduktes von Etilefrin mit Aceton (**13-Sulf**, RT 6,68 min; CE 30 eV)

Die vorgesehene Entschützung für ein Oxazolidin-Derivat wurde für das sulfokonjugierte Enamin-Derivat durchgeführt. Die Fraktion, die **13-Sulf** enthielt, wurde mit 2 M Salzsäure gerührt.<sup>102</sup> Danach konnte kein intaktes sulfokonjugiertes Etilefrin detektiert werden. Dies liegt wohlmöglich daran, dass zum einen die sauren Bedingungen zur Spaltung des Sulfatesters führen und zum anderen daran, dass die gewählten Bedingungen nicht zur Spaltung des Enamins ausreichen. Eine in der Literatur beschriebene reduktive Ringöffnung des Oxazolidin-Derivates mit Natriumborhydrid würde nicht zum gewünschten Endprodukt führen, da es zwar zu einer Spaltung der C-O-Bindung kommen würde, die Bindung zwischen Isopropyl-Rest und Stickstoff aber bestehen bleiben würde.<sup>121,122</sup> Des Weiteren ist die Stabilität des Sulfokonjugates unter reduzierenden Bedingungen nicht gegeben.

#### 4.1.2.2 Veresterung mit Ameisensäure

Eine Formiatfunktion als Schutzgruppe für die benzyliche Hydroxygruppe einzuführen, stellte sich für eine Weiterreaktion zum Sulfokonjugat als nachteilig heraus. Bei der Umsetzung von **1** mit Ameisensäure und *p*-Toluensulfonsäure (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.2.2) konnte neben zwei Produkten mit der zusätzlichen Masse einer Formiatfunktion (**14** und **15**), dem Etilefrin-Formamid-Derivat und einem Etilefrin-*mono*-Formiat-Ester auch mindestens zwei weitere Produkte nachgewiesen werden (**16** und **17**, siehe Abbildung 29).

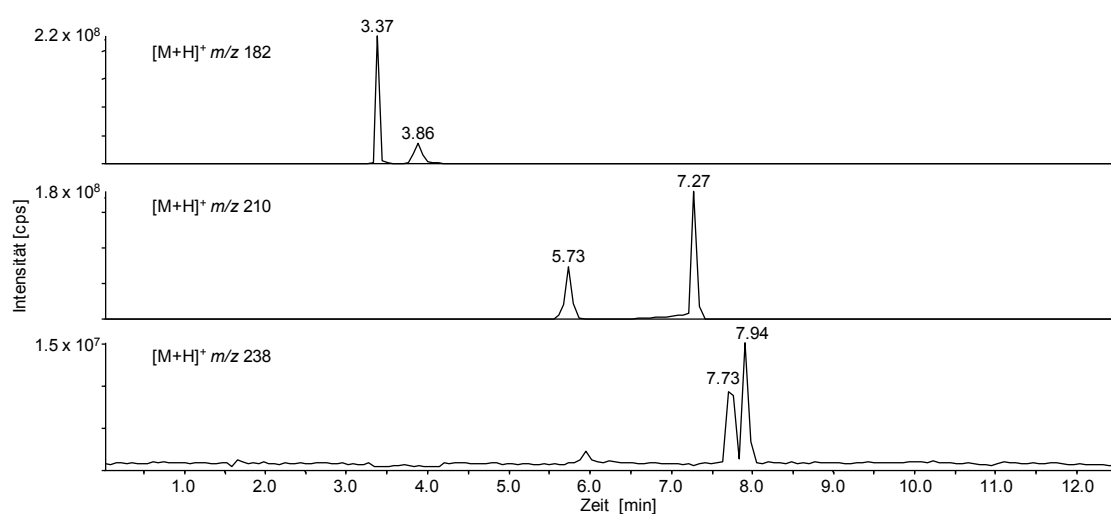


Abbildung 29 Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Quasimoleküle von Etilefrin  $[M+H]^+$  182 (**1**), Etilefrin-*mono*-formiat  $[M+H]^+$  210 (**14** und **15**) und Etilefrin-*bis*-formiat  $[M+H]^+$  238 (**16** und **17**)

Diese beiden Produkte zeigen im Massenspektrum ein  $m/z$  von 238 Da. Dies entspricht der zusätzlichen Masse einer Formiatfunktion. Es könnte sich somit um Derivate handeln, die neben der Formamid-Gruppe auch jeweils eine weitere veresterte Hydroxygruppe aufweisen. Die Reaktion mit möglichen Produkten und Nebenprodukten ist in Abbildung 30 dargestellt. Da keine saubere Fraktion des gewünschten Etilefrin-Ameisensäure-Esters (formylierte benzyliche Hydroxygruppe) erhalten wurde, wurde dieser Syntheseversuch nicht weiterverfolgt. Das Gemisch wurde nicht mit einem Sulfonierungsreagenz versetzt, da in beiden *mono*-Formiat-Derivate die benzyliche Hydroxyfunktion noch für eine Nebenreaktion mit dem Sulfonierungsreagenz zur Verfügung steht. Zum anderen wäre der Versuch des Entschützens des Formamidderivates unter Erhaltung des Sulfokongjugates nicht gewährleistet. Zum Entschützen einer Formamidfunktion werden 18 h Rühren in Natronlauge unter Reflux,<sup>123</sup> 48 h Rühren in wässriger Salzsäure und Dioxan<sup>124</sup> oder ein oxidativer Weg bei der das N-Formyl-Derivat für 2 h bei 60 °C mit 15 %igem Wasserstoffperoxid gerührt wird<sup>125</sup> beschrieben. All diese Wege gewährleisteten nicht, dass dabei ein Sulfatester intakt bleibt.

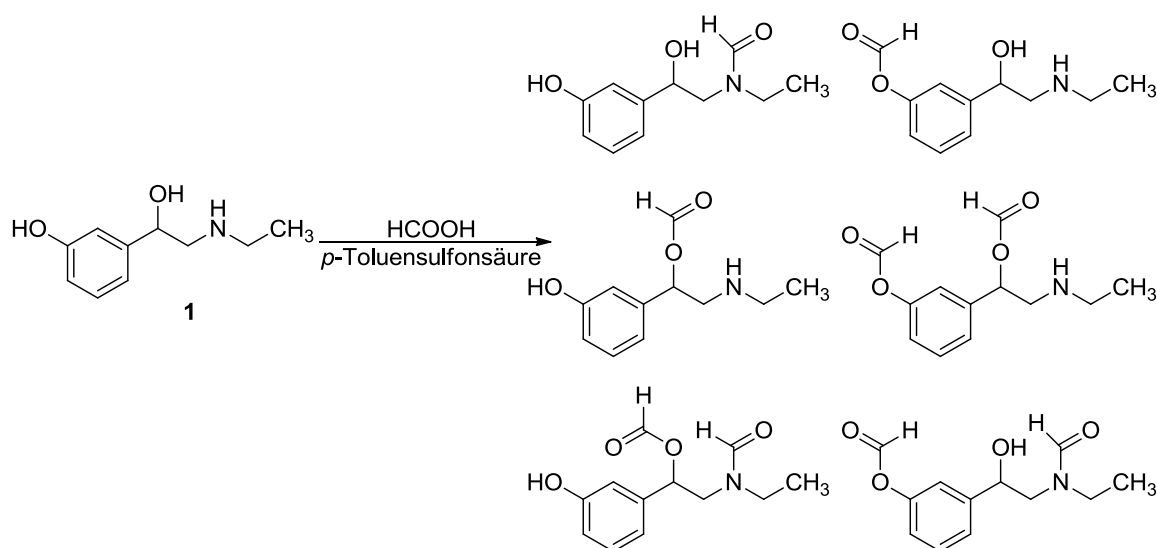


Abbildung 30 Reaktion von Etilefrin (1) mit Ameisensäure zu den möglichen *mono*- und *bis*-Formiat-Derivaten von Etilefrin

Die Produktionen-Massenspektren der erhaltenen Syntheseprodukte werden im Folgenden kurz erörtert. Abbildung 81 und Abbildung 82 (siehe Anhang, Kapitel 7.2, Seite 144) zeigen die Produktionenspektren der Quasimolekülonen  $m/z$  210 der beiden Etilefrin-*mono*-Formiate **14** und **15** bei positiver Ionisierung. In beiden Spektren ist eine Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) zum Produktion  $m/z$  192 zu beobachten, was auf eine freie alkyliche Hydroxygruppe hinweist. Die zusätzliche Abspaltung der Formyl-Funktion (-28 Da) führt zum Produktion  $m/z$  164. Eine eindeutige Strukturaufklärung ist anhand der beiden Produktionen-Massenspektren nicht möglich. Die Produktionen-Massenspektren der Quasimolekülonen im positiven Messmodus der Etilefrin-*bis*-Formiate **16** und **17** sind in Abbildung 83 und Abbildung 84 (siehe Anhang, Kapitel 7.2, Seite 145) dargestellt. Eine Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) vom Quasimolekülion  $m/z$  238 führt zum Produktion  $m/z$  220. Die zusätzliche Eliminierung einer Formyl-Gruppe (-28 Da) führt zum Produktion  $m/z$  192. Die anschließende Abspaltung der zweiten Formyl-Gruppe resultiert in  $m/z$  164. Die Möglichkeit der Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  weist auf eine freie benzyliche Hydroxygruppe hin. Eine eindeutige Strukturaufklärung ist anhand der Massenspektren nicht möglich.

### 4.1.2.3 Boc-Schutzgruppe mit angeschlossener Oxidation

Die Reaktion von Di-*tert*-butyldicarbonat mit **1** resultierte in zwei verschiedenen Produkten (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.2.3). Abbildung 31 zeigt die Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) von *mono*-Boc-Etilefrin ( $m/z$  280, **18**) und dem *bis*-Boc-Derivat von Etilefrin ( $m/z$  380, **19**). Neben der Aminfunktion hat auch eine der Hydroxygruppen mit dem Di-*tert*-butyldicarbonat reagiert. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die Produktionenspektren der beiden Synthese-Zwischenprodukte. Aus dem Quasimolekülion von **18**  $m/z$  280 (Abbildung 32) entsteht durch die Spaltung der C-O-Bindung (Abspaltung von Methylpropanol aus der Boc-Gruppe; -74 Da) das Produktion bei  $m/z$  206. Die Abspaltung der Boc-Gruppe (-100 Da) vom Quasimolekülion führt zum Produktion  $m/z$  180.

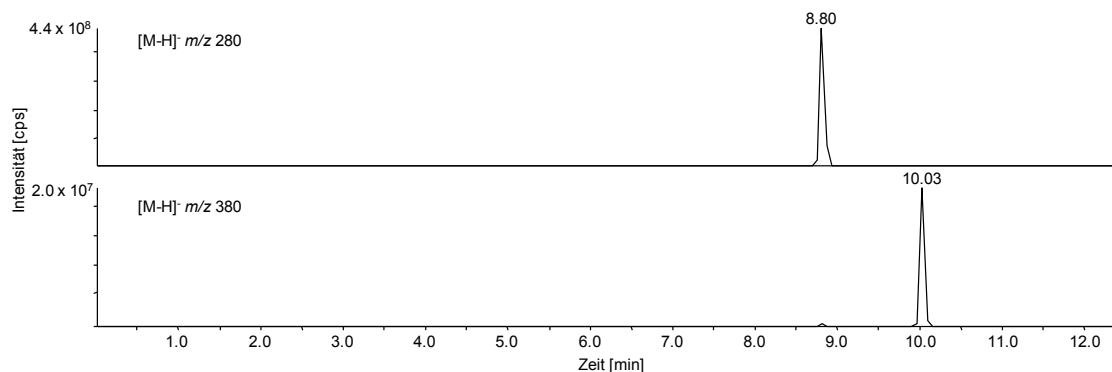


Abbildung 31 Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Quasimolekülonen von *mono*-Boc-Etilefrin (**18**,  $[M-H]^-$  280, oben) und *bis*-Boc-Etilefrin (**19**,  $[M-H]^-$  380, unten)

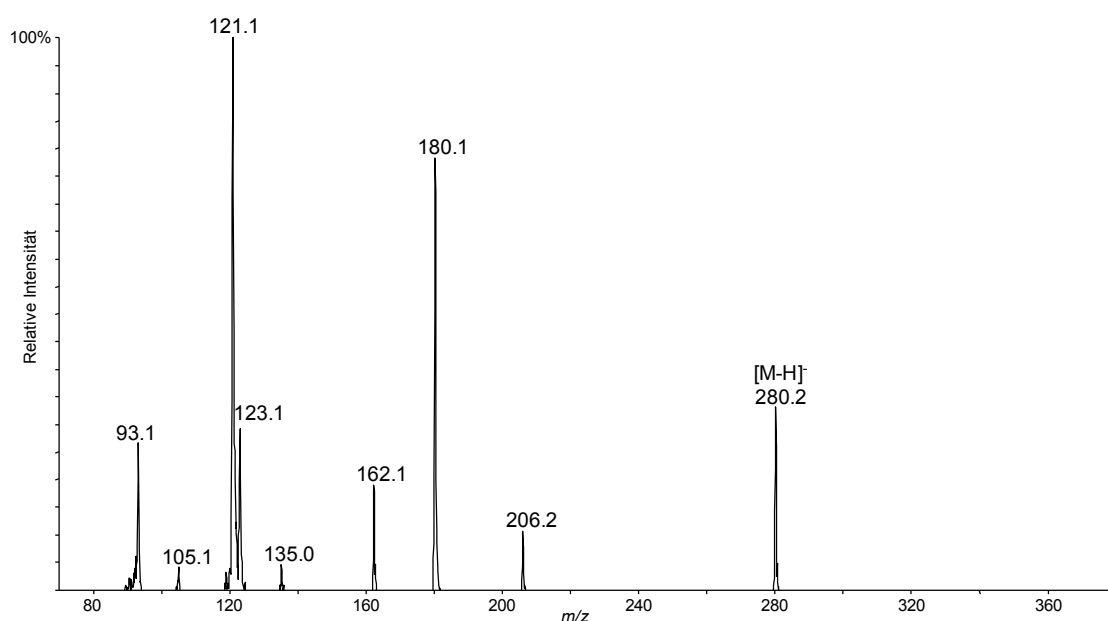


Abbildung 32 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküls  $[M-H]^-$  von *mono*-Boc-Etilefrin (**18**, RT 8,80 min; CE 30 eV)

Ausgehend vom Quasimolekülion von **19** ( $m/z$  380; Abbildung 33) entsteht durch den Verlust von einer Boc-Gruppe (-100 Da) und  $H_2O$  (-18 Da) das Produktion  $m/z$  262. Durch die zusätzliche Eliminierung von Isobuten (-56 Da) der zweiten Boc-Schutzgruppe entsteht das Produktion bei  $m/z$  206, während eine Spaltung der C-O-Bindung (Abspaltung von Methylpropanol aus der Boc-Gruppe; -74 Da) das Produktion bei  $m/z$  188 hervorbringt.

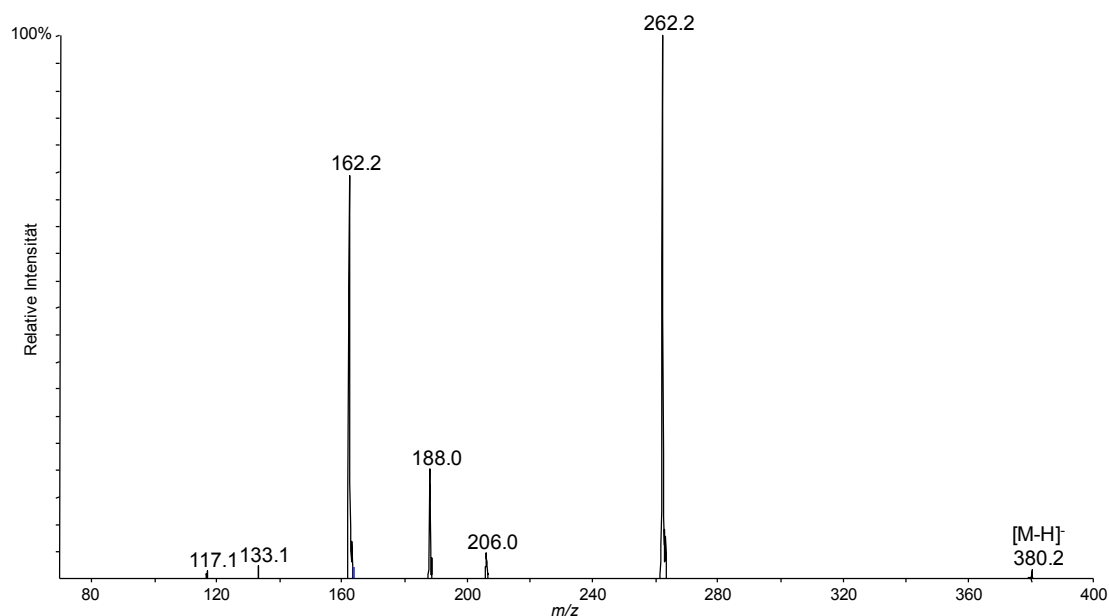


Abbildung 33 Produktionspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküls  $[M-H]^-$  von *bis*-Boc-Etilefrin (**19**, RT 10,03 min; CE 30 eV)

Nach der Aufreinigung des Ansatzes wurde die Oxidation der benzyischen Hydroxygruppe durch  $Al(CH_3)_3$  durchgeführt, jedoch konnte bei der Umsetzung zum oxidierten *mono*-Boc-geschützten Etilefrin-Derivat **18** keine zufriedenstellende Ausbeute erzielt werden. Aus diesem Grund erfolgte eine Umsetzung von nicht oxidiertem **18** mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex. Dabei entstand *mono*-sulfoiniertes und *bis*-sulfoiniertes *mono*-Boc-Etilefrin (**18-Sulf1** und **18-Sulf2**, siehe Abbildung 34, Ionenchromatogramme Abbildung 35). Ein *bis*-Boc-Etilefrin-Sulfokonjugat konnte nicht detektiert werden. Die Strukturaufklärung mit Hilfe der Produktionen-Massenspektren der Sulfokonjugate von *mono*-Boc-Etilefrin (**18**) wird im nachfolgend beschrieben.

Da bei dieser Reaktion auch ein *bis*-Sulfokonjugat entstanden ist und somit eine Aufreinigung nach Entschützen der Boc-Funktion nötig ist, bringt dieser Syntheseweg keinen Vorteil gegenüber einer direkten Synthese ohne Schutzgruppen. Somit wurde dieser Syntheseweg nicht weiterverfolgt.

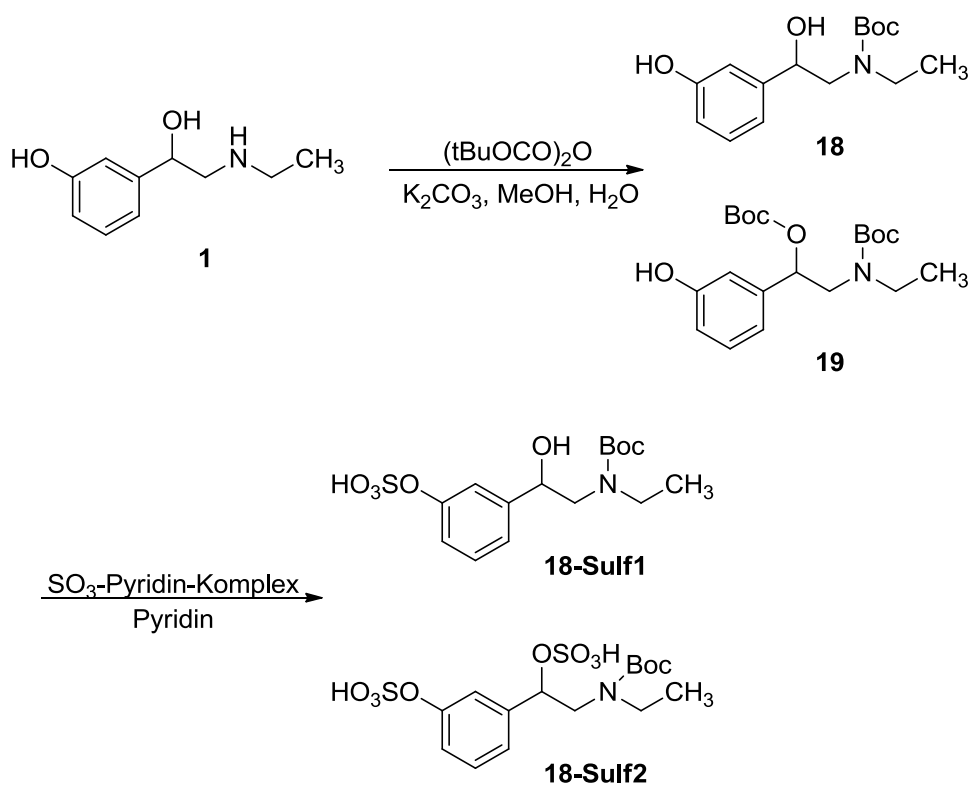


Abbildung 34 Umsetzung von Etilefrin (**1**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat und anschließende Sulfonierung

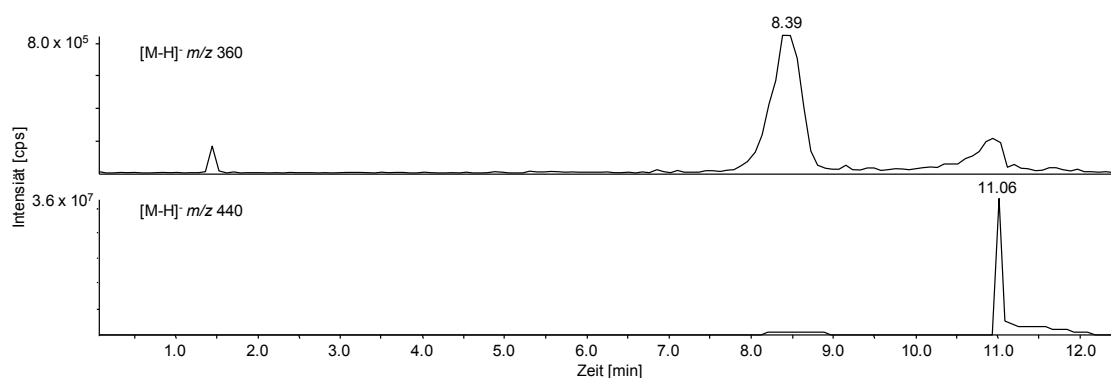


Abbildung 35 Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Quasimolekülonen von *mono*-Boc-Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat (**18-Sulf1**, [M-H]<sup>-</sup> 360, RT 8,39 min) und *mono*-Boc-Etilefrin-*bis*-Sulfokonjugat (**18-Sulf2**, [M-H]<sup>-</sup> 440, RT 11,06 min))

Abbildung 36 zeigt das Produktionspektrum von **18-Sulf1**. Das Quasimolekülion von **18-Sulf1**  $m/z$  360 spaltet die Boc-Gruppe (-100 Da) ab und führt zur Produktion bei  $m/z$  260. Die Abspaltung von 80 Da (SO<sub>3</sub>) und 74 Da (Spaltung der C-O-Bindung dadurch Abspaltung von Methylpropanol aus der Boc-Gruppe) führt zur Produktion  $m/z$  206. Der Verlust von 100 Da (Boc-Gruppe), 80 Da (SO<sub>3</sub>) und 18 Da (H<sub>2</sub>O) führt zur Produktion  $m/z$  162. Das Produktion  $m/z$  97 entspricht HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>.<sup>73,82</sup> Durch die Abspaltung von SO<sub>3</sub>

(-80 Da) vom Quasimolekül **18-Sulf2**  $m/z$  440 entsteht das Produkt  $m/z$  360 (Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 37). Die weitere Abspaltung von Isobuten (-56 Da) der Boc-Schutzgruppe führt zum Produkt bei  $m/z$  304, während eine Spaltung der C-O-Bindung (Abspaltung von Methylpropanol aus der Boc-Gruppe; -74 Da) das Produkt bei  $m/z$  286 hervorbringt. Das Produkt  $m/z$  260 wird durch die Abspaltung der Boc-Gruppe (-100 Da) und einer  $\text{SO}_3$ -Gruppe (-80 Da) vom Quasimolekül generiert. Der zusätzliche Verlust von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) führt zum Produkt  $m/z$  242. Das Produkt  $m/z$  180 wird durch die Eliminierung von einer Boc-Gruppe (-100 Da) und zwei  $\text{SO}_3$ -Gruppen ( $2 \times -80$  Da) aus dem Quasimolekül gebildet. Das Produkt  $m/z$  97 entspricht  $\text{HSO}_4^-$ .<sup>73,82</sup>

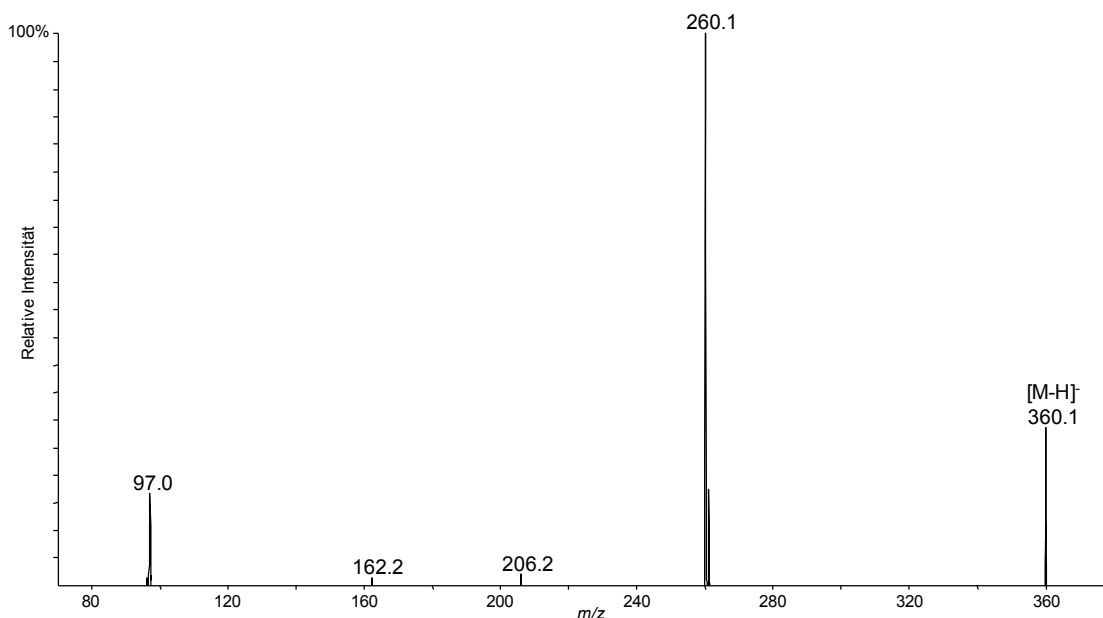


Abbildung 36 Produktionspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküls  $[\text{M-H}]^-$  von *mono*-Boc-Etilefrin-*mono*-Sulfokonjugat (**18-Sulf1**, RT 8,39 min; CE 30 eV)



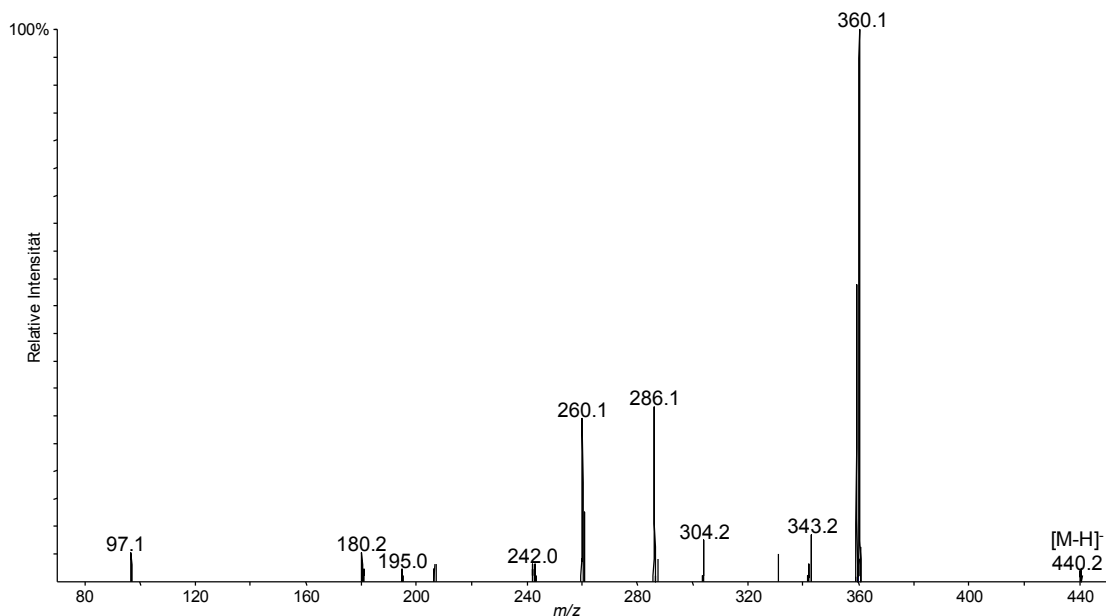


Abbildung 37 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von *mono*-Boc-Etilefrin-*bis*-Sulfokongjugat (**18-Sulf2**, RT 11,06 min; CE 30 eV)

#### 4.1.2.4 Methylboronat-Derivat

Die Reaktion von **1** mit Trimethylboroxin zu einem cyclischen Methylboronat wurde in einem kleinen analytischen Maßstab durchgeführt (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.2.4). Da das Methylboronat-Derivat in  $H_2O$  instabil ist muss die Umsetzung im wasserfreien Medium erfolgen. Die Instabilität der cyclischen Struktur des Methylboronats bewirkt bei der anschließenden Umsetzung mit dem Sulfonierungsreagenz Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex in Pyridin eine Ringöffnung (siehe Abbildung 38). So findet neben der Sulfonierung der phenolischen Funktion auch eine Sulfonierung der wieder entschützten benzylichen Hydroxygruppe statt. Die beiden *mono*-Sulfokongjugate **1-Sulf1** und **1-Sulf2** entstehen im gleichen Verhältnis wie bei der Umsetzung ohne die Methylboronat-Schutzgruppe. Auch die Umsetzung zum *bis*-Sulfokongjugat **1-Sulf3** ist zu beobachten (Ionenchromatogramme siehe Abbildung 39).

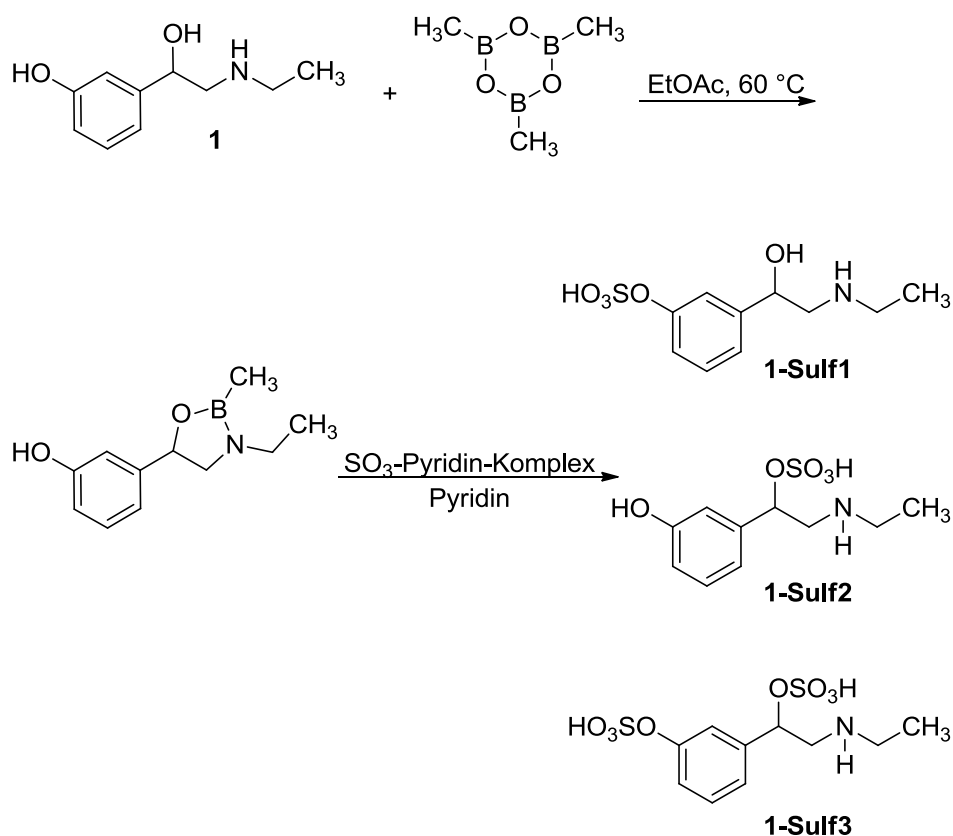


Abbildung 38 Umsetzung von Etilefrin (**1**) mit Trimethylboroxin und anschließende Sulfonierung zu **1-Sulf1**, **1-Sulf2** und **1-Sulf3**

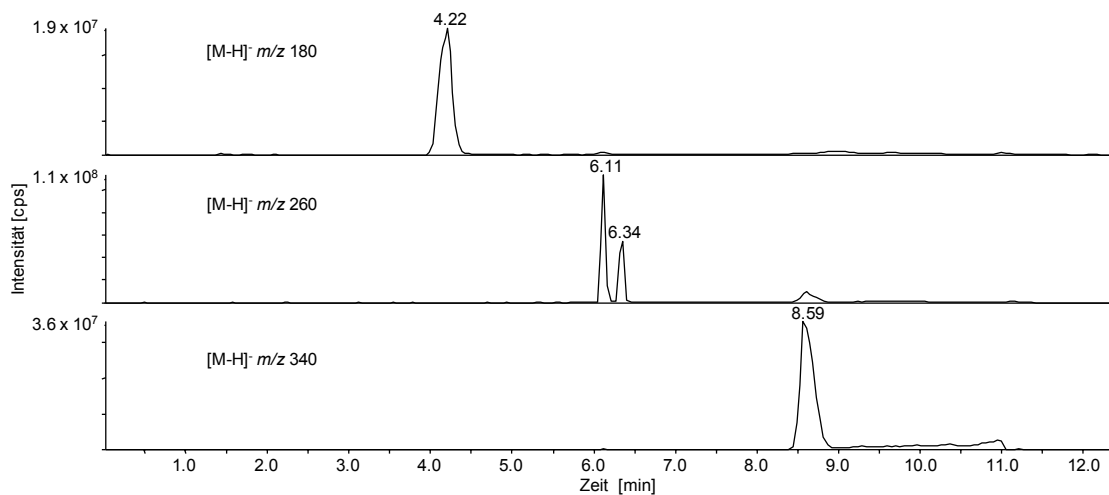


Abbildung 39 Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Quasimolekülonen von Etilefrin (**1**,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  180; Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 14, Kapitel 4.1.1), der Etilefrin *mono*-Sulfokonjugate (**1-Sulf1** und **1-Sulf2**,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  260; Produktions-Massenspektren siehe Abbildung 16 und Abbildung 18, Kapitel 4.1.1) und Etilefrin-*bis*-Sulfokonjugat (**1-Sulf3**,  $[\text{M}-\text{H}]^-$  340; Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 20, Kapitel 4.1.1)

### 4.1.3 Kontrollierte Sulfonierung von Etilefrin

Bei den in Kapitel 3.1.1.1 und Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen Experimenten stellte sich der Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex als ein wenig günstiger gegenüber dem Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex in der Sulfonierung von Etilefrin heraus. Deshalb sollte die Reaktion von **1** mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex in Pyridin optimiert werden. Bei der Reaktion entstehen drei verschiedene Produkte (Produktions-Massenspektren siehe Kapitel 4.1.1) in unterschiedlichem Verhältnis, abhängig von den angewendeten Reaktionsbedingungen (siehe Kapitel 3.1.3). Untersucht wurden hier der Einfluss des Verhältnisses der Edukte, der Einfluss der Konzentration der Edukte und der Einfluss der Temperatur jeweils mit zunehmender Reaktionsdauer. Neben den zwei verschiedenen *mono*-Sulfokonjugaten, jeweils an der phenolischen Gruppe (**1-Sulf1**) oder der benzylichen Hydroxygruppe (**1-Sulf2**) verestert, ist das *bis*-Sulfokonjugat (**1-Sulf3**) entstanden. In Abbildung 75 bis Abbildung 80 (siehe Anhang, Kapitel 7.1, ab Seite 141) ist abgebildet, wie viel der beiden möglichen *mono*-Sulfokonjugate zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sowie unter den verschiedenen Bedingungen entstanden ist. Dargestellt ist dies anhand der Signalintensität der jeweiligen Signale der *mono*-Sulfokonjugate. Ziel war es die Versuchsbedingungen bezüglich der Entstehung des phenolischen Sulfatesters zu optimieren. Daher werden die Beobachtungen der Experimente in dieser Hinsicht diskutiert.

Eine Reaktionsdauer von 1-10 h scheint sich vorteilhaft auf das Verhältnis der beiden *mono*-Sulfokonjugate hinsichtlich des favorisierten, phenolisch veresterten Konjugates (**1-Sulf1**) auszuwirken. Mit zunehmender Reaktionsdauer wird verstärkt das benzylich veresterte Konjugat (**1-Sulf2**) gebildet. Das Verhältnis der Edukte Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zu **1** von 1:1 sollte für die Reaktion gewählt werden, da weniger Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zu einer geringeren Ausbeute führt. Ein höheres Verhältnis an Sulfonierungsreagenz als es hier gewählt wurde, sollte vermieden werden, da sonst die Chance steigt, dass **1-Sulf3** entsteht.<sup>75</sup> Eine Temperatur von 60° C oder 80° C resultiert in einer höheren Ausbeute von **1-Sulf2**. Gleichzeitig wird ein starker Verlust der Ausbeute von **1-Sulf1** beobachtet. Die Reaktion bei Raumtemperatur (25° C) ergibt im Vergleich zur Reaktion bei 4° C eine leicht erhöhte Ausbeute von **1-Sulf1**, wobei die Ausbeute des konkurrierenden *mono*-Sulfokonjugates **1-Sulf2** gleich bleibt.

Eine erhöhte Konzentration von **1** im Reaktionsansatz bewirkt zum einen eine höhere Ausbeute des gewünschten Produktes **1-Sulf1**, zum anderen ist aber auch die Ausbeute der Nebenprodukte erhöht. Die Ausbeute von **1-Sulf2** ist erhöht und zusätzlich wird beobachtet, dass bei Ausgangskonzentrationen von 25 mg/mL und 50 mg/mL Etilefrin **1-Sulf3** entsteht.

Zusammengefasst ist eine Reaktionszeit zwischen 6 h und 8 h bei Raumtemperatur mit einem Verhältnis der Edukte Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zum Aglykon von 1:1 bei einer Konzentration zwischen 10 mg/mL und 20 mg/mL vorteilhaft für eine gute Ausbeute des bevorzugten *mono*-Sulfokonjugates **1-Sulf1** mit verminderten Nebenreaktionen.

### 4.1.4 Untersuchung der *in vitro*-Sulfonierung von Fenoterol

Bei den in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Untersuchungen zur Umsetzung von Fenoterol und PAPS mittels verschiedener humaner Gewebepreparationen und rekombinanten SULTs konnte eine unterschiedliche Bildung der Metaboliten von Fenoterol (**9**) beobachtet werden. Sie variierten im Ausmaß der Umsetzung des Substrates, dem Verhältnis der entstehenden Metaboliten **9-Sulf1** und **9-Sulf2** und in dem Auftreten des Metaboliten **9-Sulf3** (Strukturen siehe Abbildung 44). Die Unterschiede der verschiedenen Gewebe bei der Bildung von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** hat seine Ursache in dem qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Enzymbesatz der Organe.<sup>126</sup>

Tabelle 8 bis Tabelle 10 (siehe Anhang, Kapitel 7.4, ab Seite 151) zeigen die durch LC-MS/MS gemessenen Intensitäten und die Verhältnisse der Metaboliten unter den gewählten Bedingungen durch die verschiedenen Gewebepreparationen und in Gegenwart der beiden rekombinanten SULTs. Durch das Fehlen von Referenzmaterial war eine absolute Quantifizierung der Analyten in den Inkubationsansätzen nicht möglich. Deshalb wurden die Signalflächen der MRM-Experimente der Metaboliten benutzt, um den Umsatz der verschiedenen Ansätze zu vergleichen. Dabei musste beachtet werden, dass die Ionisationseffektivität der Metaboliten unterschiedlich sein kann. Da **9-Sulf1** und **9-Sulf2** beide phenolisch *mono*-sulfokonjugierte Produkte darstellen (Charakterisierung siehe Kapitel 4.2.1.3), wurde eine vergleichbare Ionisationseffektivität vorausgesetzt. Die erhaltenen Signalflächenwerte wurden für eine

grobe Abschätzung der Verteilung der Metaboliten benutzt. Da **9-Sulf3** ein *bis*-Sulfokonjugat darstellt, kann sich die Ionisationseffektivität von den beiden anderen Metaboliten unterscheiden. Deshalb wurde **9-Sulf3** nicht quantitativ mit den absoluten Mengen der anderen Metaboliten verglichen. Der Verlauf der Signalflächen der *in vitro*-Experimente die mittels MRM-Experimente erhalten wurden, konnten exemplarisch durch *full scan*-Experimente bestätigt werden. Dabei wurden die Ionenspuren der protonierten Moleküle der Metaboliten aus den niedrig aufgelösten *full scan*-Massenspektren extrahiert.

Abbildung 40 zeigt die Bildung der Fenoterol-Metaboliten **9-Sulf1** und **9-Sulf2** durch die Gewebepräparationen hLeS9, hLeC und hIS9 nach Inkubation mit 50  $\mu$ M PAPS für 1,5 h bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

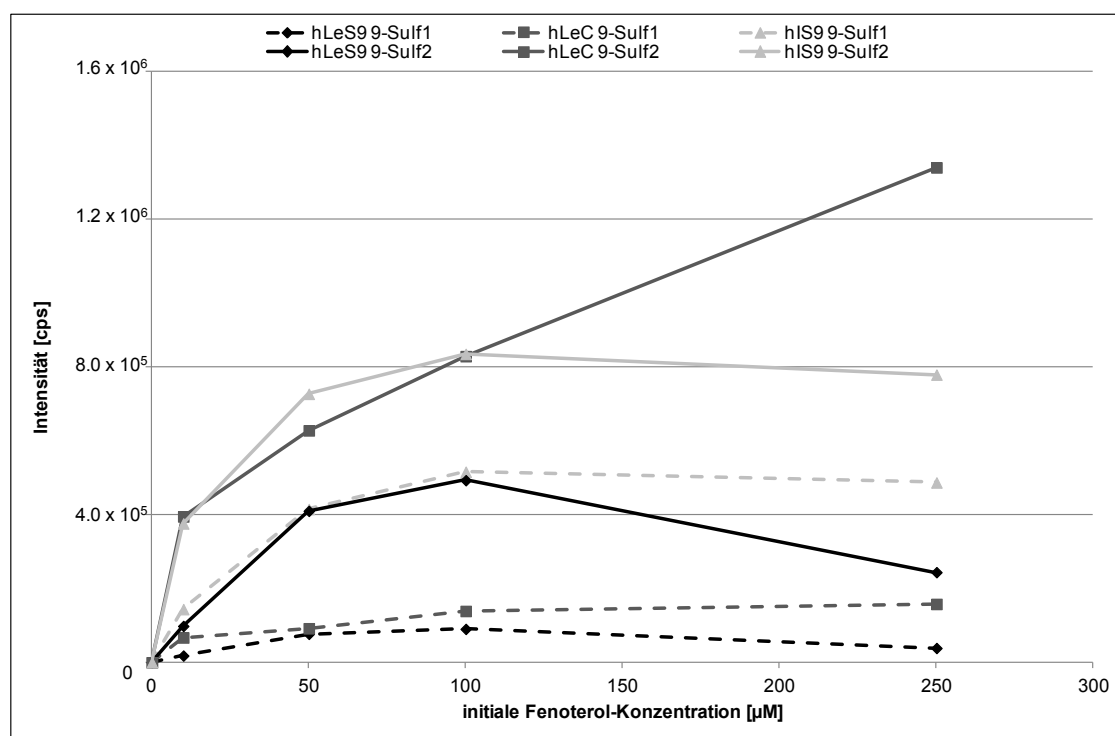


Abbildung 40 Bildung der Fenoterol *mono*-Sulfokonjugate **9-Sulf1** und **9-Sulf2** durch Inkubation von hLeS9, hLeC und hIS9 mit Fenoterol (10-250  $\mu$ M) und PAPS (50  $\mu$ M) für 1,5 h bei 37° C

**9-Sulf2** wurde von allen untersuchten Gewebepräparationen bevorzugt gebildet. Das Verhältnis von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** und die Gesamtausbeute der Metaboliten variierte zwischen den Geweben. Während hLeC den größten Anteil an **9-Sulf2** gebildet hat, blieb

die Ausbeute von **9-Sulf1** mit einem durchschnittlichen Verhältnis von 5,3:1 (**9-Sulf2:9-Sulf1**) gering. Die humane Intestinum S9-Fraktion zeigte zwar eine geringere Ausbeute an **9-Sulf2**, aber den höchsten Anteil an **9-Sulf1** bei den Gewebepreparationen (durchschnittliches Verhältnis **9-Sulf2:9-Sulf1** 1,8:1). Humane Leber S9-Fraktion setzte Fenoterol ebenfalls zu seinen Sulfokonjugaten um, und bevorzugte die Bildung **9-Sulf2** mit einem Verhältnis von **9-Sulf2:9-Sulf1** von 5,3:1. Die Gesamtausbeute war allerdings geringer als die unter Anwendung von hLeC und hIS9.

hLuS9 und hNS9 metabolisierten Fenoterol ebenfalls zu seinen Metaboliten **9-Sulf1** und **9-Sulf2**, jedoch war die Ausbeute sehr gering (siehe Anhang, Kapitel 7.4, Abbildung 93, Seite 150). Beide Gewebepreparationen bildeten bevorzugt **9-Sulf2**, wobei hLuS9 höhere Ausbeuten von **9-Sulf1** (Verhältnis **9-Sulf2:9-Sulf1** durchschnittlich 2,2:1) im Vergleich zu hNS9 (Verhältnis **9-Sulf2:9-Sulf1** durchschnittlich 4,9:1) aufgewiesen hat.

Abbildung 41 zeigt die Bildung von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** katalysiert durch die beiden rekombinanten SULTs SULT1A1 und SULT1A3.

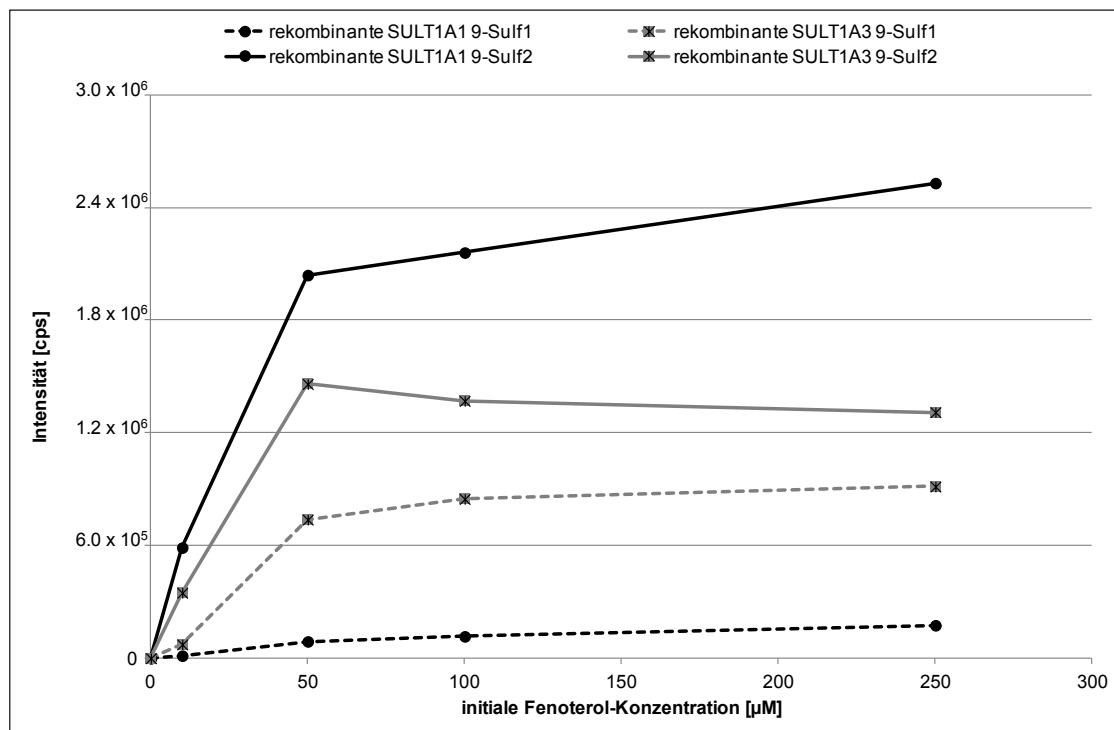


Abbildung 41 Bildung der Fenoterol *mono*-Sulfokonjugate **9-Sulf1** und **9-Sulf2** durch Inkubation von SULT1A1 und SULT1A3 mit Fenoterol (10-250 μM) und PAPS (50 μM) für 1,5 h bei 37° C

Die Umsetzung von Fenoterol mit PAPS mittels SULT1A1 resultierte in der höchsten Ausbeute an **9-Sulf2**, wobei **9-Sulf1** in geringerer Menge gebildet wurde (Verhältnis **9-Sulf2:9-Sulf1** durchschnittlich 24,2:1). Das Verhältnis der Metaboliten zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bei der Umsetzung von Fenoterol durch hLeS9 und hLeC. Diese Ähnlichkeit kann mit der dominanten Expression von SULT1A1 in der Leber erklärt werden.<sup>6</sup> So kann angenommen werden, dass **9-Sulf2** hauptsächlich von SULT1A1 produziert wird (Sulfonierung in 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Position, Strukturcharakterisierung siehe Kapitel 4.2.1.3, Nummerierung Fenoterol siehe Abbildung 44, Kapitel 4.1.5.3). Da SULT1A3 nicht in der Leber exprimiert wird, wurden in den Leber-Gewebepräparationen keine höheren Mengen an **9-Sulf1** gebildet.<sup>126</sup> Es konnte eine Bildung von **9-Sulf1** durch SULT1A1 beobachtet werden, was nicht mit Literaturdaten zur Umsetzung von Fenoterol und SULT1A1 übereinstimmt. Es wurde beschrieben, dass SULT1A1 ausschließlich die 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Position von Fenoterol sulfokonjugiert.<sup>44</sup> Da Sulfokonjugat **9-Sulf1** an der 4''-Hydroxyphenyl-Position verestert ist (Strukturcharakterisierung siehe Kapitel 4.2.1.3), konnte gezeigt werden, dass SULT1A1 auch in der Lage ist 4''-Hydroxyphenyl-Positionen zu sulfokonjugieren. Literaturdaten zur Umsetzung von SULT1A1 mit verschiedenen phenolischen Verbindungen unterstützen diese Beobachtung.<sup>78</sup>

SULT1A3 produzierte die höchste absolute Ausbeute von **9-Sulf1**, jedoch wurde **9-Sulf2** in höherem Ausmaß gebildet (Verhältnis **9-Sulf2:9-Sulf1** durchschnittlich 2,3:1). Das Verhältnis zeigte in Hinblick auf die verschiedenen initialen Fenoterol-Konzentrationen einen ähnlichen Verlauf wie bei der Umsetzung von Fenoterol mit hIS9. Dies kann der hohen Expression von SULT1A3 im Intestinum zugeschrieben werden. Die höhere Gesamtausbeute durch die Umsetzung von Fenoterol durch rekombinante Enzyme im Vergleich zu den Gewebepräparationen, ist höchstwahrscheinlich mit einer niedrigeren Gesamtkonzentration der SULTs in den Geweben zu erklären.

Das Substrat-zu-PAPS-Verhältnis hatte keinen großen Einfluss auf die Ausbeute an **9-Sulf1** und **9-Sulf2**. Das Verhältnis war aber entscheidend für die Bildung von **9-Sulf3**. Die Inkubation von 10 oder 50 µM Fenoterol mit 50 µM PAPS und die Inkubation von 50 µM Fenoterol mit 100 µM PAPS führte zur Bildung von **9-Sulf3**. Die Kombination 50 µM Fenoterol mit 100 µM PAPS führte zur höchsten Ausbeute von **9-Sulf3**. Lediglich

die Umsetzung von Fenoterol durch hIS9, SULT1A1 und SULT1A3 führte zur Bildung von Sulfokonjugat **9-Sulf3**. Da die rekombinante SULT1A3 höhere Mengen an **9-Sulf1** produzierte und zusätzlich auch **9-Sulf3** entstanden ist, liegt nahe, dass in humanem Gewebe **9-Sulf1** und **9-Sulf3** überwiegend durch SULT1A3-katalysierte Reaktionen entstehen. Diese Beobachtung wird durch Literaturdaten bestätigt, in denen beschrieben wird, dass SULT1A3 bevorzugt die 4''-Hydroxyphenyl-Position sulfokonjugiert.<sup>44</sup>

Eine zunehmende Inkubationszeit beeinflusste weder die Ausbeute noch das Verhältnis der Metaboliten, da bei den meisten durchgeführten *in vitro*-Experimenten die Ausbeute der Metaboliten über den gewählten Zeitraum von 1 bis 2 h stabil war. Steigende Ausgangskonzentrationen von Fenoterol (alle Inkubationen wurden mit 50 µM PAPS durchgeführt) gingen mit einer ansteigenden Ausbeute der Metaboliten einher, bis 100 µM Fenoterol erreicht wurde. Eine Ausnahme stellte hLeC dar, hier wurde auch bei 250 µM kein Plateau erreicht. Das Plateau, das in den Experimenten mit verschiedenen Gewebepreparationen und rekombinanten Enzymen mit zunehmender initialer Fenoterol-Konzentration beobachtet wurde (Abbildung 40 und Abbildung 41; Abbildung 93, Anhang, Kapitel 7.4, Seite 150), kann mit einer Sättigung der Enzyme erklärt werden. Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden muss, ist die Substratinhibition. Für SULT1A1 und SULT1A3 wurde bei hohen Substratkonzentrationen eine Substratinhibition beschrieben. Beide SULTs können in ihrem aktiven Zentrum zwei Substratmoleküle aufnehmen und die bei hohen Substratkonzentrationen beobachtete Inhibition ist durch eine behinderte Katalyse bei Besetzung beider Bindungsstellen zu erklären.<sup>56,58,69,127</sup>

Auf diesen Ergebnissen basierend wurden die Parameter für eine optimierte *Scale-Up*-Präparation der drei Sulfokonjugate von Fenoterol gewählt. Die Umsetzung von Fenoterol und PAPS (Verhältnis 1:2) katalysiert durch SULT1A3 liefert den besten Ansatz um eine ausreichende Menge für die Charakterisierung aller Metaboliten zu erhalten.



## 4.1.5 Referenzverbindungen

### 4.1.5.1 Octopamin-Sulfokonjugat

Die in Kapitel 3.1.5.1 beschriebene Synthese von Octopamin-Sulfokonjugat erbrachte das phenolisch veresterte Sulfokonjugat (Abbildung 42, **2-Sulf**, RT: 3,06 min). Die ausgedehnte Aufreinigung durch präparative LC-UV, führte zu einer sauberen Fraktion mit einer kleinen Menge **2-Sulf**. Ein weiteres sulfokonjugiertes Strukturisomer wie ein weiteres *mono*-Sulfokonjugat oder *bis*-sulfoniertes Produkt konnte nicht detektiert werden. Die Aufklärung der Sulfonierungsposition wird in Kapitel 4.2.1.1 und 4.2.2.1 beschrieben.

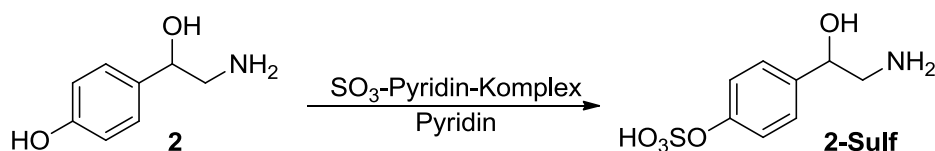


Abbildung 42 Synthese von Octopamin (**2**) und seinem Sulfokonjugat (**2-Sulf**)

### 4.1.5.2 Terbutalin-Sulfokonjugat

Bei der Synthese von Terbutalin-Sulfokonjugat (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.5.2) sind verschiedene Sulfokonjugate entstanden. Zwei *mono*-Sulfokonjugate (Abbildung 43, Retentionszeit (RT) von **7-Sulf1**: 6,32 min, RT von **7-Sulf2**: 6,52 min), zwei *bis*-Sulfokonjugate (Abbildung 43, RT von **7-Sulf3** 8,67 min und von **7-Sulf4** 9,28 min) und ein *tris*-Sulfokonjugat (Abbildung 43, RT von **7-Sulf5** 11,04 min) konnten nachgewiesen werden. Die aufwendige Aufreinigung des Ansatzes durch wiederholte Säulenchromatographie ergab jeweils eine saubere Fraktion der *mono*-Sulfokonjugate **7-Sulf1** und **7-Sulf2**. Die Bestimmung der Sulfonierungspositionen wird in Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2.2 beschrieben.

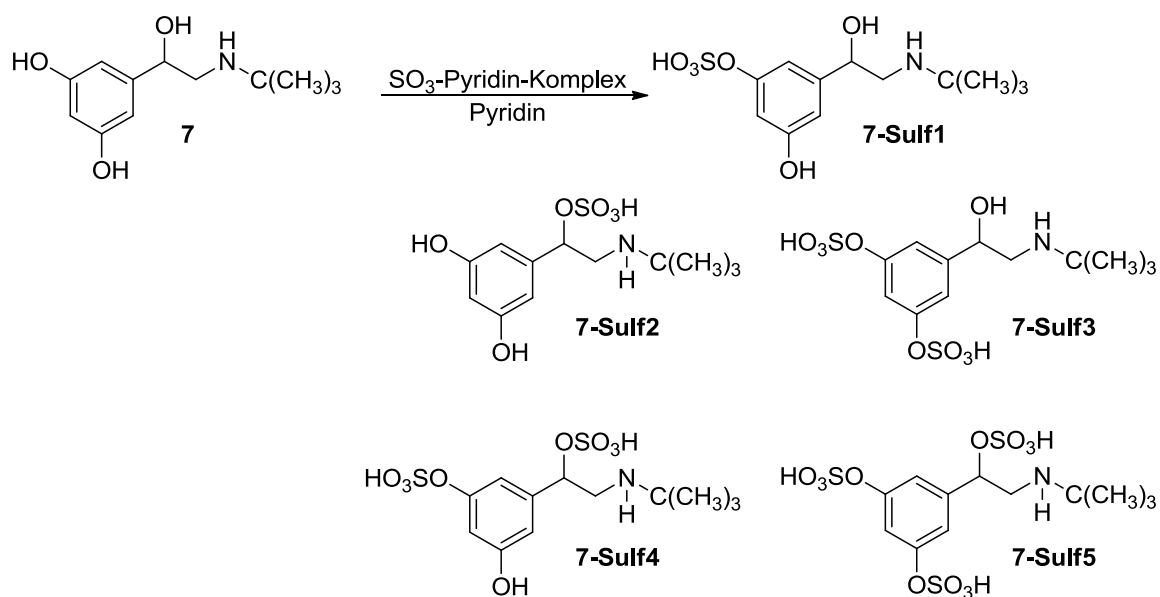


Abbildung 43 Synthese von Terbutalin (**7**) und seinen Sulfokonjugaten **7-Sulf1**, **7-Sulf2**, **7-Sulf3**, **7-Sulf4** und **7-Sulf5**

#### 4.1.5.3 Fenoterol-Sulfokonjugat

Der *Scale-up* (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.1.5.3) des optimierten *in vitro*-Vorversuchs aus Kapitel 3.1.4 ergab drei verschiedene Fenoterol-Sulfokonjugate (Strukturen siehe Abbildung 44, Ionenchromatogramm siehe Abbildung 45). Neben den *mono*-Sulfokonjugaten (RT LC-MS/MS von **9-Sulf1** 7,42 min; RT von **9-Sulf2** 7,70 min) entstand ein weiterer Metabolit mit scheinbar demselben Molekulargewicht ( $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  384). **9-Sulf3** (RT LC-MS/MS 9,24 min) wies aber eine abweichende Retentionszeit auf und wurde deshalb als *bis*-Sulfokonjugat vermutet, welches durch eine *in-source* Fragmentierung einer  $\text{SO}_3$ -Gruppe bei  $m/z$  384 detektiert wurde. Durch die anschließenden HRMS-Messungen (LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS; Bedingungen siehe Kapitel 3.4.6) ist es gelungen das intakte Quasimolekülion von **9-Sulf3** ( $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  464) zu detektieren (Ionenchromatogramm siehe Abbildung 46). Die sich stark unterscheidenden Retentionszeiten der Ionenchromatogramme in Abbildung 45 und Abbildung 46 ergeben sich aus unterschiedlichen Säulenmaterialien der beiden verschiedenen Systeme. Die präparative LC-Aufreinigung erzeugte saubere Fraktionen der drei Metaboliten von Fenoterol: die Fraktion von 12,02 min bis 12,28 min enthielt **9-Sulf1**, die Fraktion von 12,80 min bis 13,06 min enthielt **9-Sulf2** und die Fraktion von

15,50 min bis 15,76 min enthält **9-Sulf3**. Die Bestimmung der Sulfonierungspositionen wird in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben.

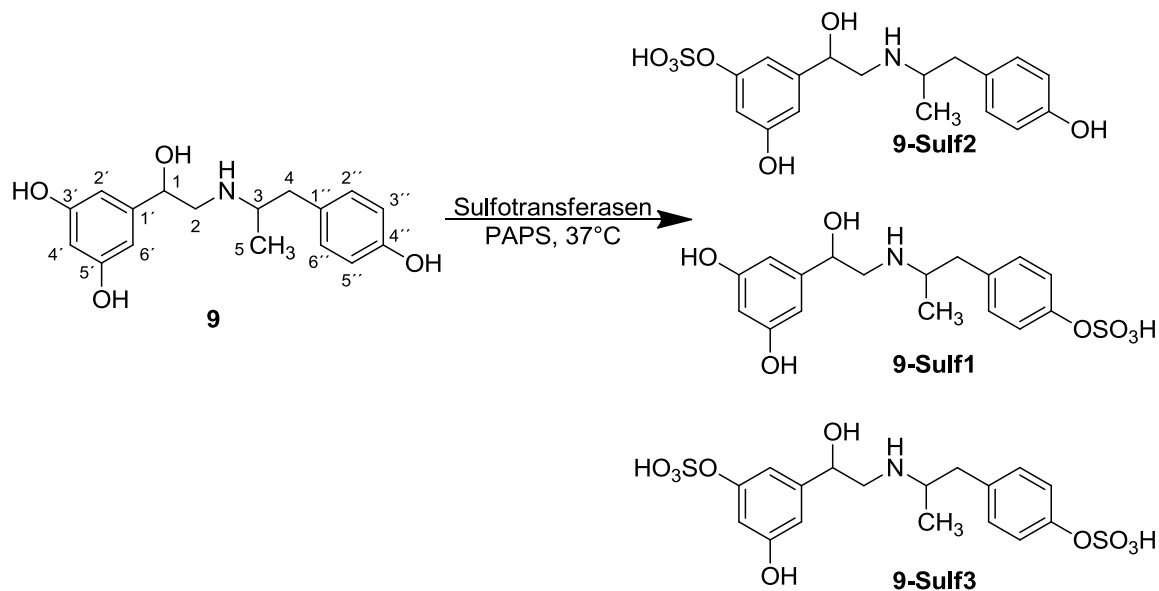


Abbildung 44 Umsetzung von Fenoterol mittels Sulfotransferasen zu den Sulfokonjugaten **9-Sulf1**, **9-Sulf2** und **9-Sulf3**

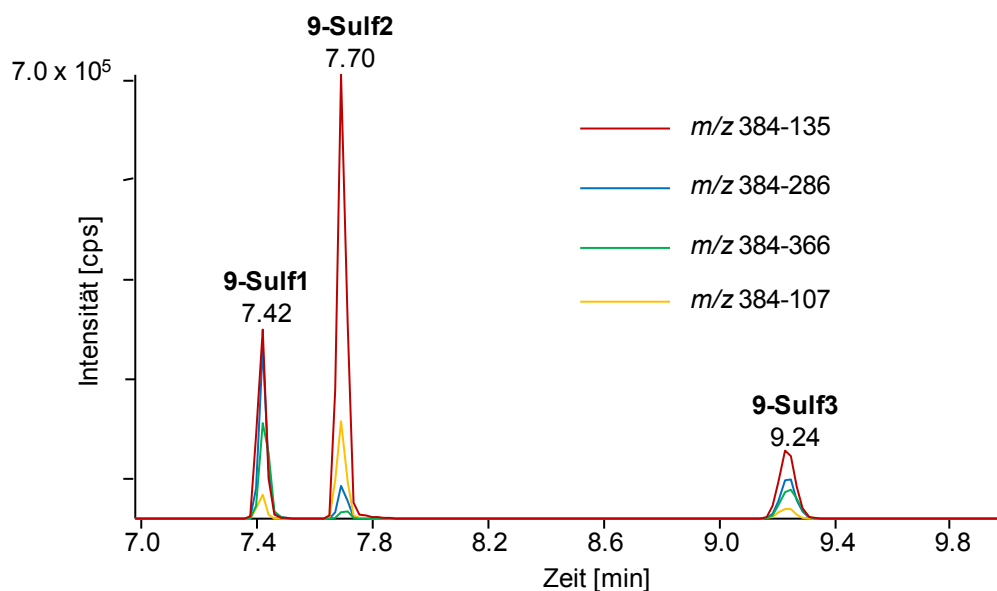


Abbildung 45 Kombinierte, extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus; CE 30 eV) von **9-Sulf1**, **9-Sulf2** und **9-Sulf3** generiert durch *in vitro*-Synthese (50  $\mu$ M Fenoterol, 100  $\mu$ M PAPS, 0,25 mg/mL Protein SULT1A3, 2 h Inkubationszeit)

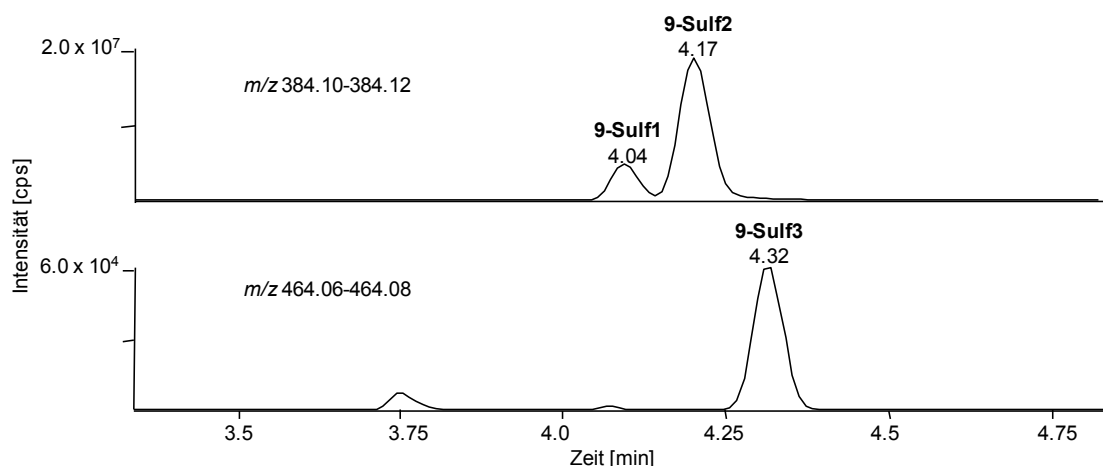


Abbildung 46 Extrahiertes Ionenchromatogramm (LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS, CE 19 eV) eines *in vitro*-Ansatzes (50  $\mu$ M Fenoterol, 100  $\mu$ M PAPS, 0,25 mg/mL Protein SULT1A3, 2 h Inkubationszeit) von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** (oben) und Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat **9-Sulf3** (unten)

#### 4.1.5.4 Salbutamol-Sulfokonjugat

Die in Kapitel 3.1.5.4 beschriebene Aufreinigung der Salbutamol-Ausscheidungsurine führte zu angereicherten und aufgereinigten Salbutamol-Sulfokonjugat Fraktionen. Die Fraktionen von 9,5 min bis 10,1 min enthielten **10-Sulf**. Die Fraktionen wurden vereinigt, eingedampft und standen somit der HRMS-Charakterisierung zur Verfügung. Die Bestimmung der Sulfonierungspositionen wird in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben.

#### 4.1.6 Schlussfolgerung der Synthese von Referenzverbindungen

Bei der Synthese der Sulfokonjugate können abhängig von der Struktur des Eduktes verschiedenen Nebenprodukte entstehen, da sowohl eine alkyliche bzw. benzyliche Hydroxygruppe als auch Amine mit dem Sulfonierungsreagenz Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex reagieren können. Die Untersuchungen zu einer selektiven Synthese von Sulfokonjugaten von Phenoletanolaminen konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Sowohl die benzyliche Hydroxygruppe als auch der sekundäre Stickstoff stehen in Konkurrenz zum Phenol. Für eine Schutzgruppenreaktion konnte sowohl durch ein Boc-Derivat, einen Formiat-Ester, als auch durch einen Ringschluss zum Oxazoloidin-Derivat bzw. die Erzeugung eines Methylboronat-Derivats kein Produkt isoliert werden, das an der Phenolgruppe sulfokonjugiert und nach angeschlossener Entschützung noch intakt war. Eine ausreichende Stabilität der Sulfokonjugate bei den Bedingungen, die

zum Entschützen notwendig war, ist nicht gegeben. Des Weiteren sind auch die Schutzgruppenreaktionen selber in der Regel nicht selektiv verlaufen. Durch die Untersuchungen mit den verschiedenen Sulfonierungsreagenzien Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex, Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex und 2,2,2-Trichlorethyl-chlorsulfat konnte gezeigt werden, dass keines der Edukte regioselektiv eine Hydroxygruppe sulfoniert. Für den Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex wurde eine leichte Präferenz der Bildung des phenolischen Sulfokonjugates beobachtet. Bei der Untersuchung zu den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zur Sulfonierung von Etilefrin mit dem Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex ergab sich, dass sich zur Verminderung von Nebenreaktionen zum benzyllischen *mono*-Sulfokonjugat oder zum *bis*-Sulfokonjugat vor allem eine Reaktion bei Raumtemperatur bei nicht zu hoher Konzentration von Etilefrin in Pyridin eignet. Zusammengefasst ist eine Reaktionszeit zwischen 6 h und 8 h bei Raumtemperatur mit einem Verhältnis der Edukte Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex zum Aglykon von 1:1 bei einer Konzentration zwischen 10 mg/mL und 20 mg/mL vorteilhaft für eine gute Ausbeute des bevorzugten *mono*-Sulfokonjugates **1-Sulf1** mit verminderten Nebenreaktionen.

Mittels *in vitro*-Reaktion unter Anwendung humaner Gewebepreparationen (S9-Fraktionen und Cytosol) und rekombinanter SULTs konnten drei verschiedene Sulfokonjugate von Fenoterol synthetisiert werden. Dabei zeigte sich unter variierenden Inkubationsbedingungen von Fenoterol, PAPS und sowohl S9-Fraktionen als auch Cytosol von verschiedenen Geweben und den rekombinanten SULTs eine unterschiedliche Ausbeute der Metaboliten. Die verschiedenen Ansätze unterschieden sich in der Intensität der gebildeten Metaboliten, dem Verhältnis der Metaboliten zueinander und in dem Auftreten des dritten Metaboliten **9-Sulf3**. Die Unterschiede im Umsatz der verschiedenen Gewebepreparationen sind mit dem unterschiedlichen Enzymbesatz der Gewebe zu erklären. Der Umsatz der in hLS9 und hLC beobachtet wurde, ähnelte dem von SULT1A1, während hIS9 sich ähnlich verhielt wie SULT1A3. Da SULT1A3 überwiegend im Intestinum und nicht in der Leber exprimiert wird, stimmen diese Beobachtungen mit früheren Studien zur Verteilung dieser Enzyme überein.<sup>7,126</sup> Die Beobachtung, dass SULT1A1 und SULT1A3 in der Lage sind die Phenolgruppen der 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl- und 4''-Hydroxyphenyl-Position zu sulfokonjugieren, stimmt

nicht mit Literaturdaten überein. Über SULT1A1 wird berichtet, dass diese ausschließlich 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Positionen sulfokonjugiert. Die hier dargestellten Experimente zeigen aber, dass beide Positionen durch SULT1A1 sulfokonjugiert werden, wobei das Enzym die 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Positionen aber bevorzugt. Der optimale Ansatz zum generieren aller drei Metaboliten von Fenoterol stellt die Inkubation von Fenoterol mit PAPS in einem molaren Verhältnis von 1:2 mit SULT1A3 für 1 bis 2 h dar. Einen Nachteil des *in vitro*-Ansatzes stellt die geringe Ausbeute dar. Um eine ausreichende Menge an Metaboliten zu generieren, damit NMR-Analytik und eine Validierung durchgeführt werden kann, eignet sich dieses Verfahren nicht. Die hohen Kosten, die mit dem Einsatz der rekombinanten Enzyme und des PAPS einhergehen, limitieren die Anwendung dieses Syntheseweges. Eine Charakterisierung der Metaboliten und die Entwicklung eines analytischen Verfahrens sind aber dennoch möglich. Auch die Möglichkeit Metaboliten aus Urin zu gewinnen, wurde erfolgreich durchgeführt. Dabei ist aber die Menge an Metabolit, der im Körper entsteht, limitierend für die Ausbeute, so dass auch hier die Menge zu gering ist, um eine Validierung und NMR-Charakterisierung durchzuführen.

So ist es gelungen, Referenzsubstanzen der humanen Metaboliten Octopamin-Sulfokonjugat, Terbutalin-Sulfokonjugat, Fenoterol-Sulfokonjugate und Salbutamol-Sulfokonjugat herzustellen. Octopamin-Sulfokonjugat ist ohne weitere Nebenprodukte entstanden. Die erfolgreiche Herstellung von sulfokonjugiertem Terbutalin ergab beide möglichen *mono*-Sulfokonjugate (phenolisch oder benzyliche Hydroxygruppe verestert) in geringer Ausbeute neben zwei *bis*-Sulfokonjugaten und einem *tris*-Sulfokonjugat. Nach einer ausgeweiteten Säulenaufreinigung wurde eine saubere Fraktion des phenolisch konjugierten Sulfokonjugates von Terbutalin in geringer Ausbeute erhalten. Die optimierte *in vitro*-Synthese von Fenoterol-Sulfokonjugaten erbrachte insgesamt drei Metaboliten (*mono*- und *bis*-Sulfokonjugate), die mit Hilfe von präparativer LC-UV aufgereinigt wurden. In Zukunft sollte die präparative LC-UV-Aufreinigung der wiederholten Säulenchromatographie bevorzugt werden, da somit ein weitaus geringerer Aufwand betrieben werden muss.

## 4.2 Charakterisierung der Referenzsubstanzen

### 4.2.1 MS und HRMS

#### 4.2.1.1 Octopamin-Sulfokonjugat

Die Produktionenspektren von freiem Octopamin (**2**) und seinem synthetisierten Sulfokonjugat (**2-Sulf**) sind in Abbildung 47 und Abbildung 48 abgebildet. Die Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von **2** und **2-Sulf** und die resultierenden Produktionen, ermittelt durch hochaufgelöste, massengenaue MS<sup>n</sup>-Experimente (LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>-MS) sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Octopamin wurde bei  $m/z$  136,0755 ( $C_8H_{10}ON$ , Fehler: 1,44 ppm) bestimmt, da bei dem hier verwendeten Gerät aufgrund einer *in-source*-Fragmentierung (Verlust von  $H_2O$ , -18 Da) die intakte Substanz ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  154 Da,  $C_8H_{11}O_2N$ ) nicht detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte die *in-source*-Fragmentierung bei der Verwendung des Triple Quadrupol-LIT-Instruments nicht beobachtet werden. Dies ist aufgrund der unterschiedlichen Bauweise der ESI-Ionenquellen möglich. In Abbildung 47 ist das Produktionen-Massenspektrum des intakten Quasimoleküls ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  154 Da) dargestellt. Es entsteht durch eine Wasserabspaltung (-18 Da) das Hauptfragment  $m/z$  136, der anschließende Verlust der Aminofunktion (-17 Da) führt zu dem Produktion  $m/z$  119. Für **2-Sulf** wurde mittels HRMS-Experimente ein  $m/z$ -Wert der intakten Substanz von 234,0430 (Fehler: 0,25 ppm) mit einer Elementarzusammensetzung von  $C_8H_{12}O_5NS$  bestimmt. In Abbildung 48 ist das Produktionen-Massenspektrum **2-Sulf** im positiven Messmodus gezeigt. Die Elimination von  $H_2O$  (-18 Da) generiert das Produktion  $m/z$  216. Dieses Fragmentierungsverhalten ist ein Hinweis auf die Sulfonierungsposition, da eine Abspaltung von  $H_2O$  nur an freien aliphatischen Hydroxygruppen stattfinden kann. Der anschließende Verlust von  $SO_3$  (80 Da) ist charakteristisch für Quasimoleküle von Sulfateestern nach CID<sup>82</sup> und generiert das Produktion  $m/z$  136. Die Abspaltung der Aminogruppe (-17 Da) produziert analog zum Aglykon das Produktion  $m/z$  119. Die resultierende Elementarzusammensetzung der Produktionen wurde durch die hier durchgeführten HRMS-Experimente bestätigt (Tabelle 2).

Tabelle 2 Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von Octopamin (-H<sub>2</sub>O) und Octopamin-Sulokonjugat und resultierende Produktionen ermittelt durch HRMS-Experimente (MS<sup>n</sup>, LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>-MS)

Verbindung	Vorläuferion ( <i>m/z</i> )		Elementare Zusammen- setzung (exp.)	Fehler (ppm)	NCE (arb. units)	Produkt- ion ( <i>m/z</i> )	Elementare Zusammen- setzung (exp.)	Fehler (ppm)	Ab- spaltung
	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>							
<b>2</b> (RT 2,42 min) <i>(in source- Eliminierung von H<sub>2</sub>O)</i>	136,0755		C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ON	1,4	35	119,0490	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	1,6	NH <sub>3</sub>
						118,0650	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N	0,8	H <sub>2</sub> O
						109,0646	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O	1,9	CHN
						91,0539	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	3,2	CH <sub>3</sub> ON
<b>2-Sulf</b> (RT 3,07 min)	234,0430	216,0324	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> NS	0,6	25	136,0324	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> NS	0,6	H <sub>2</sub> O
						119,0489	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	1,7	SO <sub>3</sub> , NH <sub>2</sub>
						118,0650	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N	1,5	SO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> O
						109,0646	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O	2,0	SO <sub>3</sub> , CHN
						91,0539	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	3,2	SO <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> ON

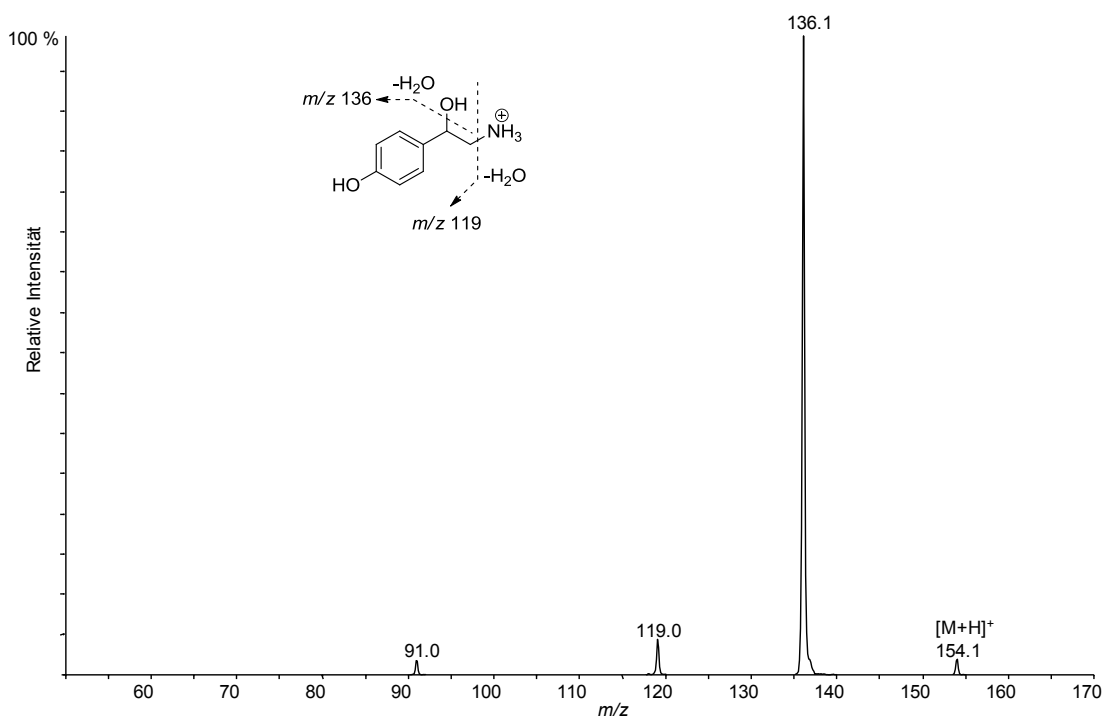


Abbildung 47 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls [M+H]<sup>+</sup> von Octopamin (**2**, RT 2,42 min, CE 5 eV)



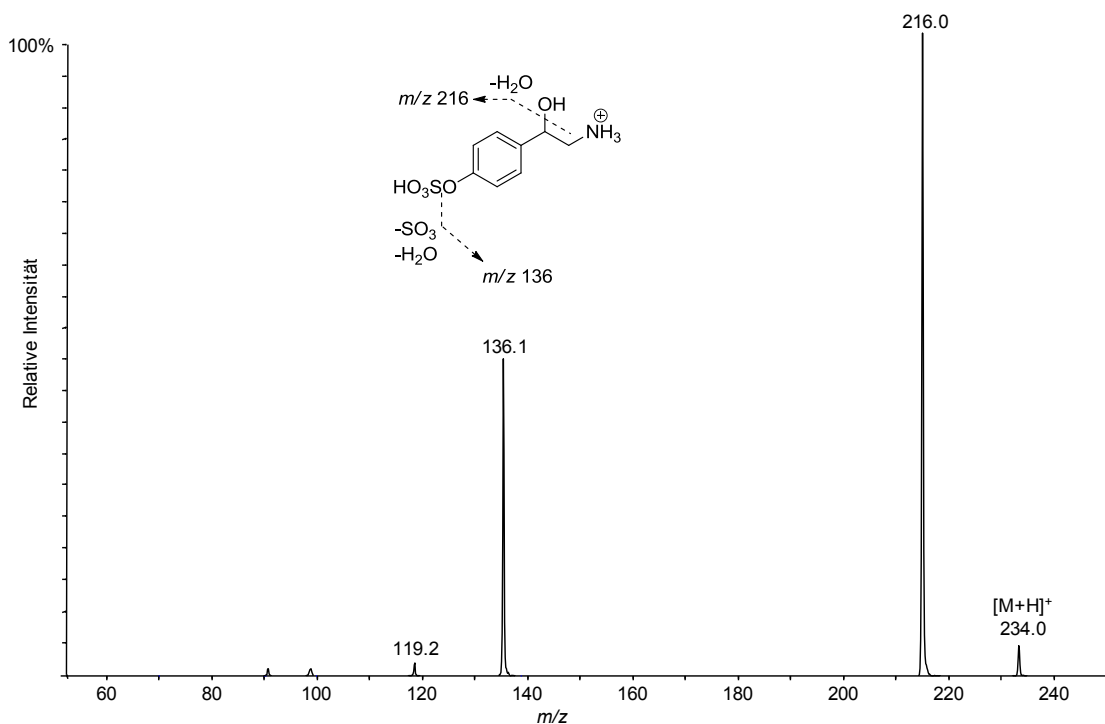


Abbildung 48 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Octopamin-Sulfokongjugat (**2-Sulf**, RT 3,07 min, CE 15 eV)

#### 4.2.1.2 Terbutalin-Sulfokongjugat

Abbildung 49 bis Abbildung 54 zeigen Produktionenspektren von Terbutalin (**7**) und den sulfokongjugierten Syntheseprodukten (**7-Sulf1** bis **7-Sulf5**). Eine *mono*-Sulfonierung beider phenolischen Gruppen ergeben das gleiche Produkt, da die Bindung zwischen Phenylrest und aliphatischer Seitenkette frei drehbar ist. Die Bestimmung, ob die phenolische Gruppe oder die benzyliche Hydroxygruppe sulfokongjugiert ist, wird im Folgenden beschrieben.

Die Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von **7-Sulf1** und **7-Sulf2** und die resultierenden Produktionen, ermittelt durch hochaufgelöste, massengenaue  $MS^n$ -Experimente (LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>-MS) sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3 Elementare Zusammensetzung und resultierende Produktionen der protonierten Moleküle der Terbutalin-*mono*-Sulfokonjugate ermittelt durch HRMS-Experimente ( $MS^n$ , LTQ-Orbitrap<sup>TM</sup>-MS)

Verbindung	Vorläuferion ( $m/z$ )		Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	NCE (arb. units)	Produktion ( $m/z$ )	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	Ab-spaltung
	$MS^2$	$MS^3$							
<b>7-Sulf1</b> (RT 6,32 min)	306,1003		$C_{12}H_{20}O_6NS$	-0,8	15	250,0376	$C_8H_{12}O_6NS$	-1,7	$C_4H_8$
						232,0270	$C_8H_{10}O_5NS$	-1,7	$C_4H_8$ , $H_2O$
						226,1434	$C_{12}H_{20}O_3N$	-1,7	$SO_3$
						152,0702	$C_8H_{10}O_2N$	-2,7	$C_4H_8$ , $H_2O$ , $SO_3$
		226,1433	$C_{12}H_{20}O_3N$	-2,0	15	208,1327	$C_{12}H_{18}O_2N$	-2,3	$H_2O$
						152,0702	$C_8H_{10}O_2N$	-2,9	$C_4H_8$ , $H_2O$
<b>7-Sulf2</b> (RT 6,52 min)	306,1005		$C_{12}H_{20}O_6NS$	-0,4	17	208,1330	$C_{12}H_{18}O_2N$	-1,2	$H_2SO_4$
						152,0703	$C_8H_{10}O_2N$	-2,2	$C_4H_8$ , $H_2SO_4$
		208,1329	$C_{12}H_{18}O_2N$	-1,3	23	152,0703	$C_8H_{10}O_2N$	-2,2	$C_4H_8$

Das Produktionen-Massenspektrum von **7-Sulf1** (Abbildung 50,  $m/z$  306) zeigt einen Verlust von 80 Da ( $SO_3$ ) und ergibt die Produktion bei  $m/z$  226 mit geringer Intensität. Dieser Fragmentierungsweg wurde mittels HRMS bestätigt. Die nachfolgende Elimination von  $H_2O$  (-18 Da) und Isobuten (-56 Da) generiert die Produktionen  $m/z$  208 (geringe Intensität) und  $m/z$  152 (entspricht  $C_8H_{10}O_2N$ ), welche bereits in der Literatur für die Fragmentierung von freiem Terbutalin (Produktionen-Massenspektrum siehe Abbildung 49) beschrieben wurden.<sup>91</sup> Ebenfalls durch den Verlust von Isobuten (-56 Da) und  $H_2O$  (-18 Da) entstehen aus dem Quasimolekülion von **7-Sulf1** die Produktionen  $m/z$  250 und  $m/z$  232. Der Verlust von  $H_2O$  ist ein Hinweis der Sulfonierungsposition, da ein Wasserverlust nur an freien aliphatischen Hydroxygruppen stattfinden kann.

Im Gegensatz dazu zeigt das Produktionen-Massenspektrum (Abbildung 51) von **7-Sulf2** ( $m/z$  306) keinen Verlust von 80 Da und anschließende Eliminierung von  $H_2O$  (-18 Da) und Isobuten (-56 Da). Hier wird durch den Verlust von  $H_2SO_4$  (-98 Da) eine Produktion bei  $m/z$  208 erzeugt, was durch die HRMS-Ergebnisse bestätigt wurde. Das Fehlen des Wasserverlusts vom Quasimolekülion ( $m/z$  306) bekräftigt die Annahme, dass **7-Sulf1** an der Phenolgruppe und **7-Sulf2** an der benzyliischen Hydroxygruppe verestert ist. Neben der Eliminierung von  $H_2SO_4$  zeigt das Produktionen-Massenspektrum den Verlust von Isobuten (-56 Da), was das Hauptfragment  $m/z$  152 hervorbringt.

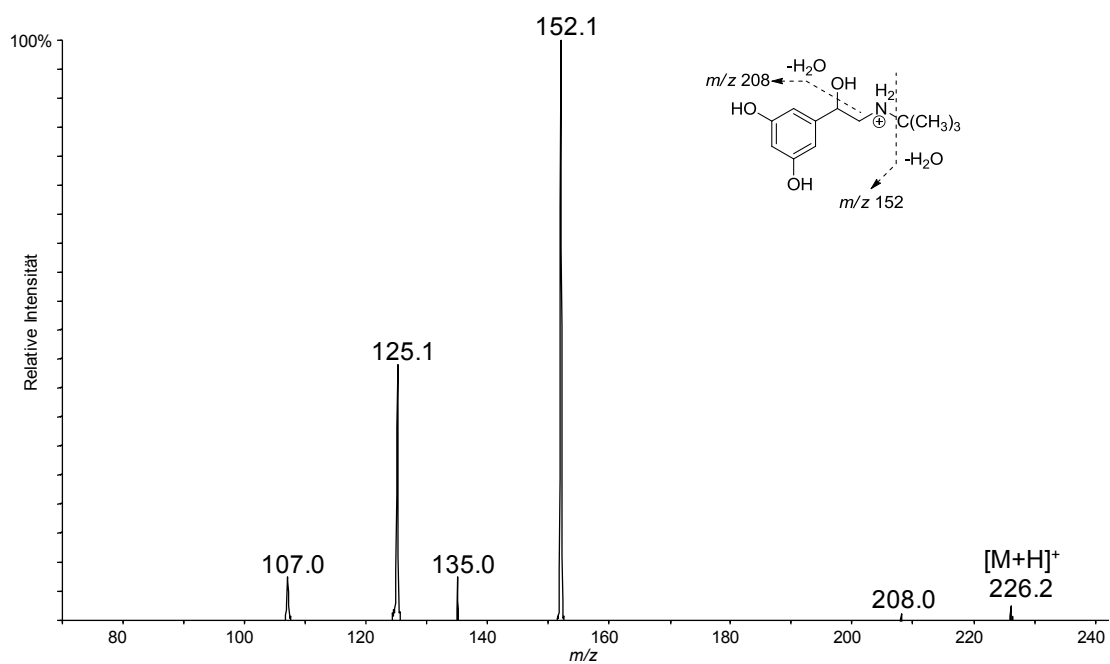


Abbildung 49 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Terbutalin (**7**, RT 5,94 min; CE 30 eV)

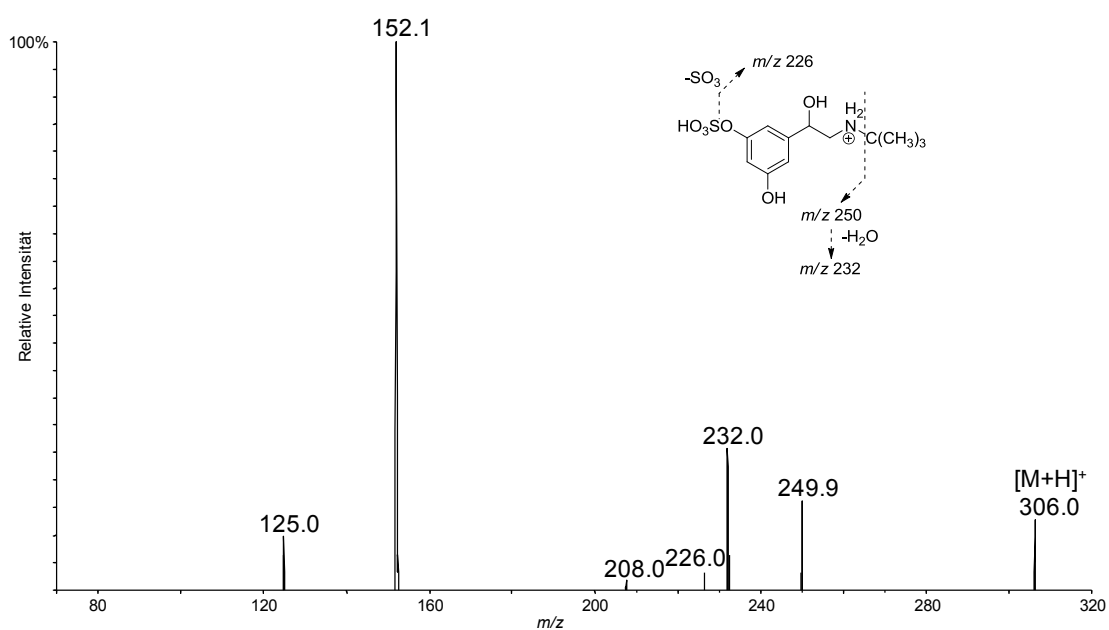


Abbildung 50 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Terbutalin-*mono*-Sulfokongjugat 1 (**7-Sulf1**, RT 6,32 min; CE 30 eV)

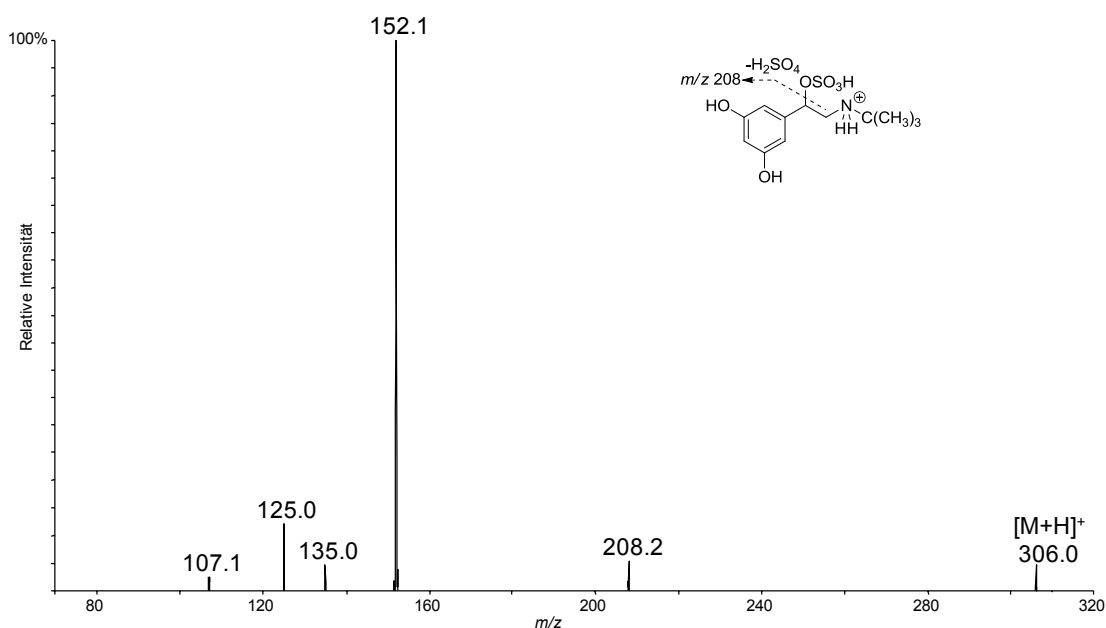


Abbildung 51 Produktionspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Terbutalin- *mono*-Sulfokongjugat 2 (**7-Sulf2**, RT 6,52 min; CE 30 eV)

Die *bis*-Sulfokongjugate sind ebenfalls durch ihr Fragmentierungsverhalten klar voneinander unterscheidbar. Ausgehend vom *bis*-Sulfokongjugat **7-Sulf3** ( $m/z$  386; Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 52) entsteht durch Neutralverlust von Isobuten (-56 Da) aus dem Quasimolekülion ( $m/z$  386) und es ergibt sich ein Produktion bei  $m/z$  330, welches durch den darauffolgenden Verlust von  $H_2O$  (-18 Da) ein Produktion  $m/z$  312 generiert. Dies weist auf eine unkonjugierte benzyliche Hydroxygruppe hin und es ergibt sich somit, dass **7-Sulf3** an beiden phenolischen Gruppen verestert ist. Die Produktionen  $m/z$  232 und  $m/z$  152 werden aus  $m/z$  312 durch schrittweise Eliminierung von  $SO_3$  (jeweils -80 Da) gebildet. Das *bis*-Sulfokongjugat **7-Sulf4** ( $m/z$  386; Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 53) zeigt einen Verlust von  $H_2SO_4$  (-98 Da), aus dem das Produktion bei  $m/z$  288 hervorgeht, was auf eine Veresterung der benzylichen Hydroxygruppe hinweist, da im Spektrum kein Verlust von  $H_2O$  (-18 Da) zu beobachten ist. So ergibt sich, dass **7-Sulf4** an einer der phenolischen Gruppen und an der benzylichen Hydroxygruppe sulfokongjugiert ist. Die zusätzliche Eliminierung von  $SO_3$  (-80 Da) generiert  $m/z$  208, und der Verlust von Isobuten (-56 Da) führt zu dem Produktion  $m/z$  232, welches wiederum durch eine Eliminierung von  $SO_3$  (-80 Da)  $m/z$  152 generiert.

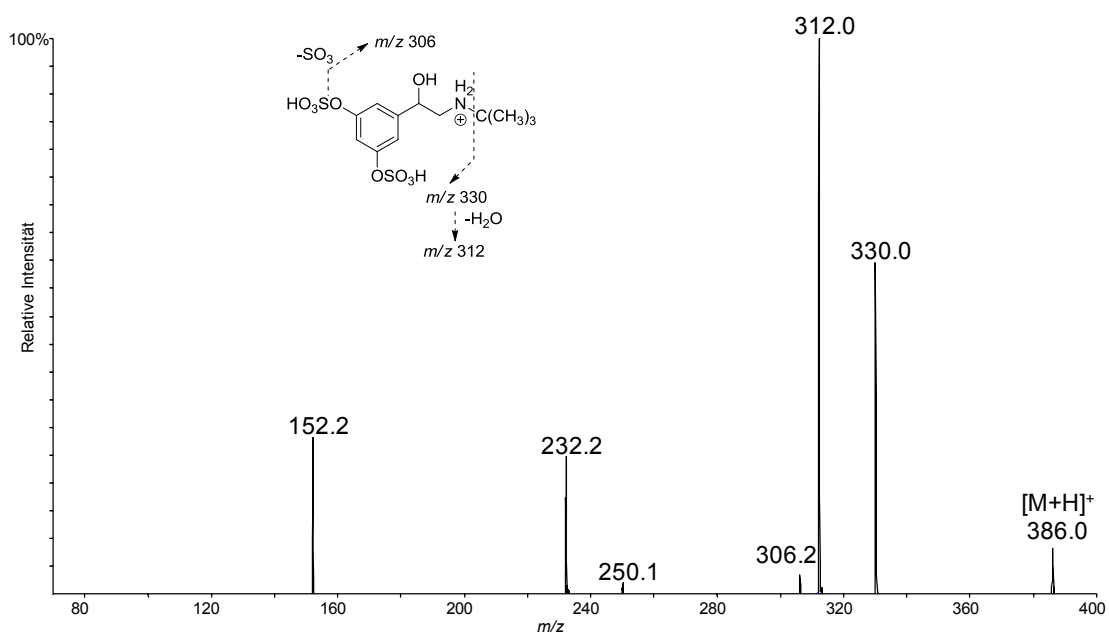


Abbildung 52 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Terbutalin-*bis*-Sulfokonjugat (**7-Sulf3**, RT 8,67 min; CE 30 eV)

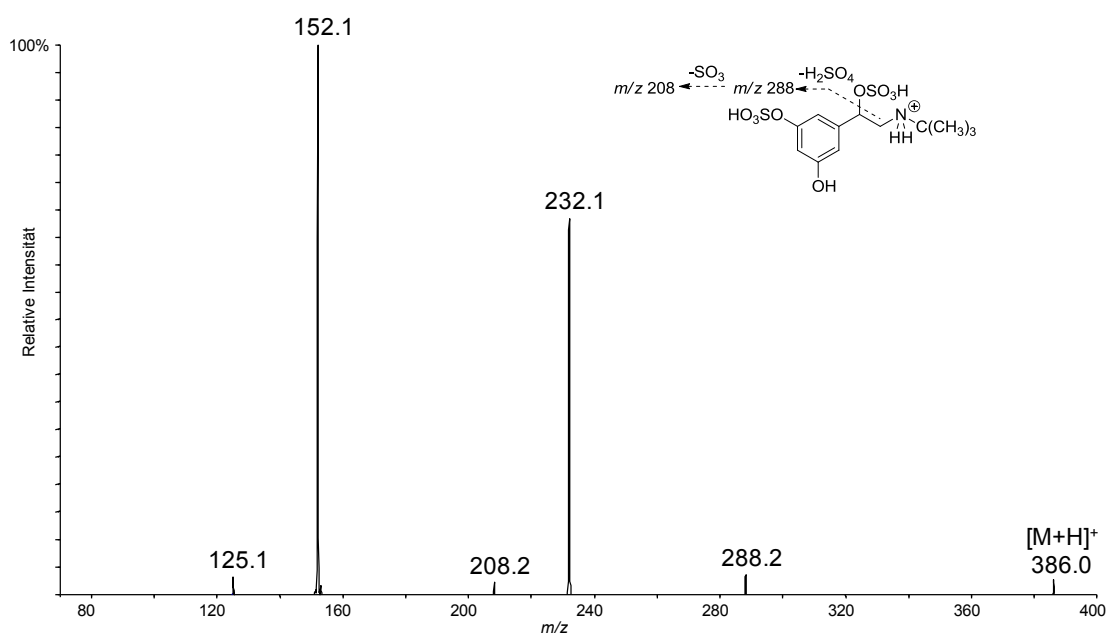


Abbildung 53 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Terbutalin-*bis*-Sulfokonjugat (**7-Sulf4**, RT 9,28 min; CE30 eV)

Das *tris*-Sulfokonjugat **7-Sulf5** ( $m/z$  466; Produktionen-Massenspektrum siehe Abbildung 54) generiert durch die Eliminierung von Isobuten (-56 Da)  $m/z$  410, welches wiederum  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (-98 Da) und zweimal  $\text{SO}_3$  (jeweils -80 Da) eliminiert, um nacheinander die Produktionen  $m/z$  312,  $m/z$  232 und  $m/z$  152 zu bilden.

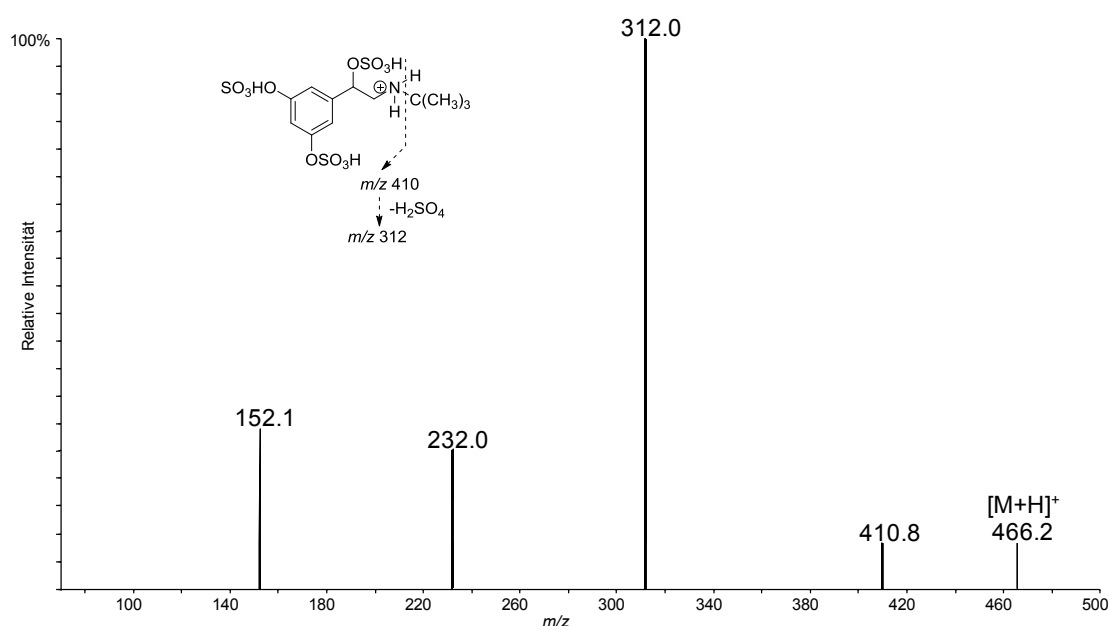


Abbildung 54 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[\text{M}+\text{H}]^+$  von Terbutalin-*tris*-Sulfokonjugat (**7-Sulf5**, RT 11,04 min; CE 30 eV)

#### 4.2.1.3 Fenoterol-Sulfokonjugat

Die hochaufgelösten, massengenauen Produktionenspektren von Fenoterol (**9**) und seinen Sulfokonjugaten **9-Sulf1**, **9-Sulf2** und **9-Sulf3** sind in Abbildung 55 bis Abbildung 57 und Abbildung 61 dargestellt. Die Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von **9** und seinen Sulfokonjugaten **9-Sulf1**, **9-Sulf2** und **9-Sulf3** und die resultierenden Produktionen, ermittelt durch hochaufgelöste, massengenaue  $\text{MS}^2$ -Experimente, sind in Tabelle 4 zusammengefasst (LC-Quadrupol/Orbitrap-MS).

Die Produktionen-Massenspektren von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** (Abbildung 56 und Abbildung 57) weisen einen Verlust von 80 Da ( $-\text{SO}_3$ ) vom Quasimolekülion  $m/z$  384 auf, durch den das Produktion  $m/z$  304 entsteht. Dieser Fragmentierungsweg wurde mittels HRMS bestätigt und beweist, dass sich der Verlust von 80 Da aus einem Schwefel-Atom und drei Sauerstoff-Atomen zusammensetzt. Die anschließende Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$

(-18 Da) und 4-Propylphenol (-135 Da) generiert die Produktionen  $m/z$  286 und  $m/z$  152, die auch schon für die Fragmentierung von freiem Fenoterol (**9**, Produktionen-Massenspektrum siehe Abbildung 55) in der Literatur beschrieben wurden.<sup>91</sup> Das Produktion  $m/z$  107 entspricht dem Spaltprodukt von C 3 und C 4 von freiem Fenoterol. Die Eliminierung von H<sub>2</sub>O (-18 Da) führt zu dem Produktion  $m/z$  366, was auf eine freie aliphatische Hydroxygruppe hinweist. Die charakteristischen Produktionen für eine Bestimmung der Position der Sulfatester sind für **9-Sulf1**  $m/z$  244,  $m/z$  215 und  $m/z$  187. Diese Produktionen enthalten alle ein Schwefelatom und gehören zu dem Sulfatester der 4''-Hydroxyphenylgruppe nach Spaltung der aliphatischen Kette des Moleküls, was durch HRMS bestätigt wurde. Die Spaltung der Bindung zwischen dem Stickstoffatom und C 2 (Nummerierung siehe Abbildung 44, Kapitel 4.1.5.3) führt zum Produktion  $m/z$  244, während die Spaltung der Bindung zwischen dem Stickstoffatom und C 3 zu Produktion  $m/z$  215 führt. Das Produktion  $m/z$  187 ist dem Spaltprodukt der Bindung zwischen C 3 und C 4 zuzuordnen. MS<sup>3</sup>-Experimente (Ionenübergang  $m/z$  384-215) zeigen, dass  $m/z$  215 SO<sub>3</sub> (-80 Da) verliert, um  $m/z$  135 zu generieren. Dies zeigt ebenfalls, dass **9-Sulf1** an der 4''-Hydroxyphenylgruppe verestert ist. Für die Bestimmung der Position des Sulfatesters von **9-Sulf2** sind die Produktionen  $m/z$  250 und  $m/z$  232 charakteristisch, die beide ein Schwefelatom besitzen. Die Spaltung der Bindung zwischen dem Stickstoffatom und C 3 führt zu  $m/z$  250. Der weitere Verlust von H<sub>2</sub>O (-18 Da) führt zum Produktion  $m/z$  232. MS<sup>3</sup>-Experimente (Ionenübergang  $m/z$  384-232) zeigten, dass  $m/z$  232 SO<sub>3</sub> (-80 Da) eliminiert, um das Produktion  $m/z$  152 zu generieren. Das bestätigt, dass **9-Sulf2** am Resorcin-Rest verestert ist.

Tabelle 4 Elementare Zusammensetzung und resultierende Produktionen der protonierten Moleküle von Fenoterol und seinen Sulfokonjugaten ermittelt durch HRMS-Experimente (MS<sup>2</sup>, LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS)

Verbindung	Vorläufer-ion(m/z)	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	CE (eV)	Produktion (m/z)	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	Abspaltung
<b>9</b> (RT 3,90 / 6,72 min)	304,1541	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> N	-0,8	15	286,1430	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N	-2,8	H <sub>2</sub> O
					170,0806	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> N	-3,1	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O
					164,1063	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> ON	-4,3	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
					152,0700	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N	-3,9	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O, H <sub>2</sub> O
					135,0803	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O	-1,3	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N
					107,0491	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	-0,5	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N
<b>9-Sulf1</b> (RT 4,04 / 7,43 min)	384,1108	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> NS	-1,0	19	366,1005	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> NS	-0,3	H <sub>2</sub> O
					304,1542	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> N	-0,4	SO <sub>3</sub>
					286,1435	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N	-0,9	H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					244,0638	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> NS	0,1	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
					215,0371	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> S	-0,8	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N
					187,0058	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> S	-1,0	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N
					152,0706	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N	0,1	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O, H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					135,0804	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O	-0,2	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N, SO <sub>3</sub>
<b>9-Sulf2</b> (RT 4,17 / 7,70 min)	384,1106	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> NS	-1,4	19	107,0493	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	1,3	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N, SO <sub>3</sub>
					366,1004	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> NS	-0,6	H <sub>2</sub> O
					304,1545	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> N	0,6	SO <sub>3</sub>
					286,1434	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N	-1,2	H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					250,0380	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> NS	0,1	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
					232,2760	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> NS	0,9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O, H <sub>2</sub> O
					164,1068	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> ON	-1,2	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S
					152,0705	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N	-0,7	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O, H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
<b>9-Sulf3</b> (RT 4,32 / 9,57 Min)	464,0670	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> NS <sub>2</sub>	-2,0	19	135,0805	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O	0,7	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N, SO <sub>3</sub>
					107,0495	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	3,1	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N, SO <sub>3</sub>
					384,1101	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub> NS	-2,8	SO <sub>3</sub>
					366,0996	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub> NS	-2,6	H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					304,1542	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> N	-0,5	2 x SO <sub>3</sub>
					286,1438	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> N	0,2	H <sub>2</sub> O, 2 x SO <sub>3</sub>
					250,0381	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> NS	0,3	SO <sub>3</sub> , C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O
					232,0273	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> NS	-0,4	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O, H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					152,0707	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N	0,4	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O, H <sub>2</sub> O, 2 x SO <sub>3</sub>
					135,0804	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O	-0,1	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N, 2 x SO <sub>3</sub>
					107,0494	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O	2,4	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N, 2 x SO <sub>3</sub>



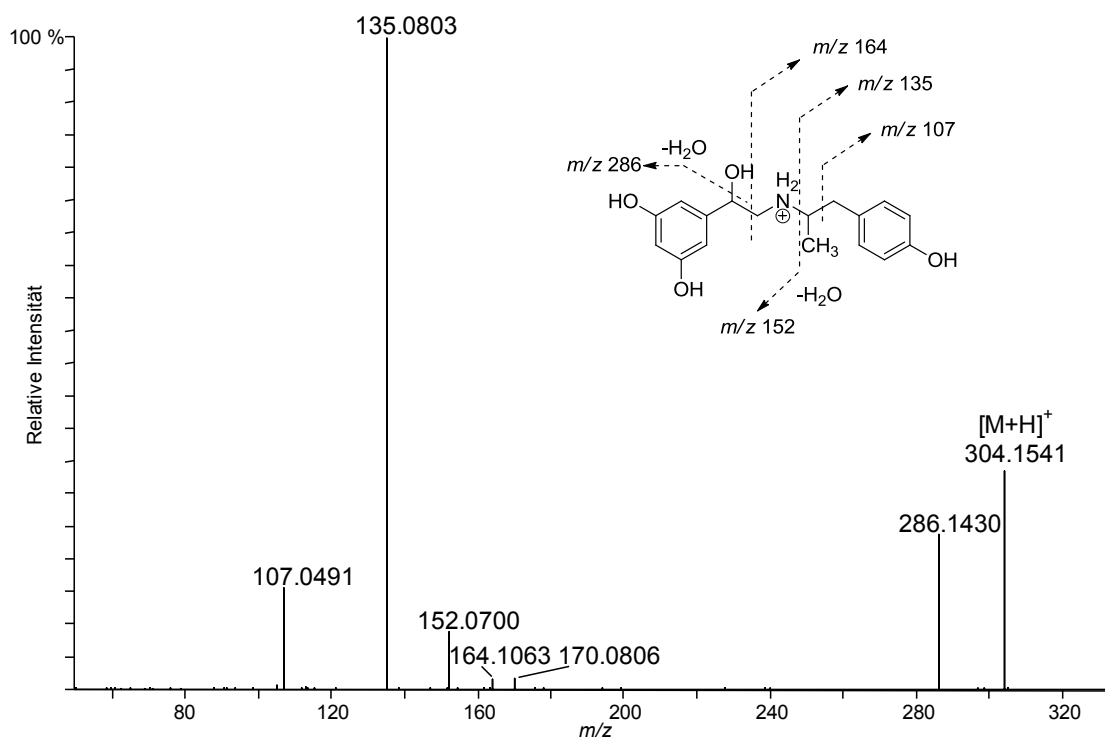


Abbildung 55 Produktionenspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von freiem Fenoterol (**9**, CE 15 eV)

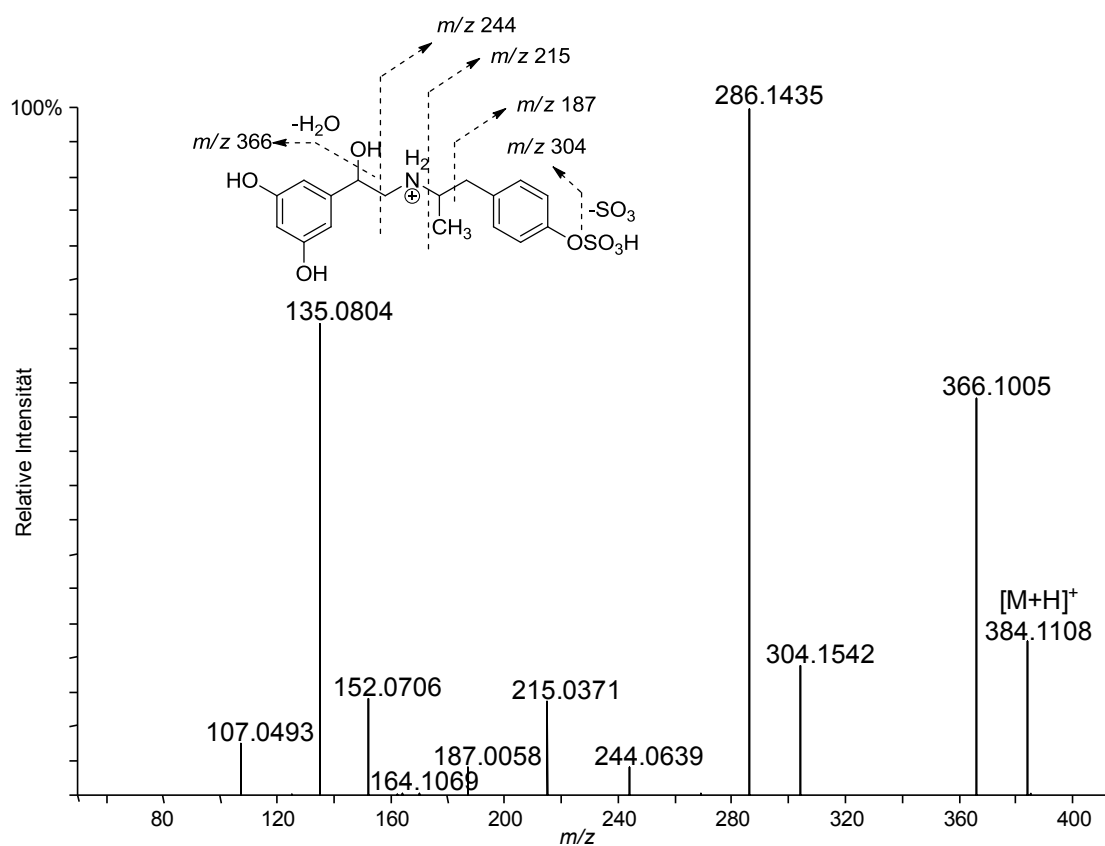


Abbildung 56 Produktionenspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Fenoterol-mono-Sulfokongjugat 1 (**9-Sulf1**, CE 19 eV)

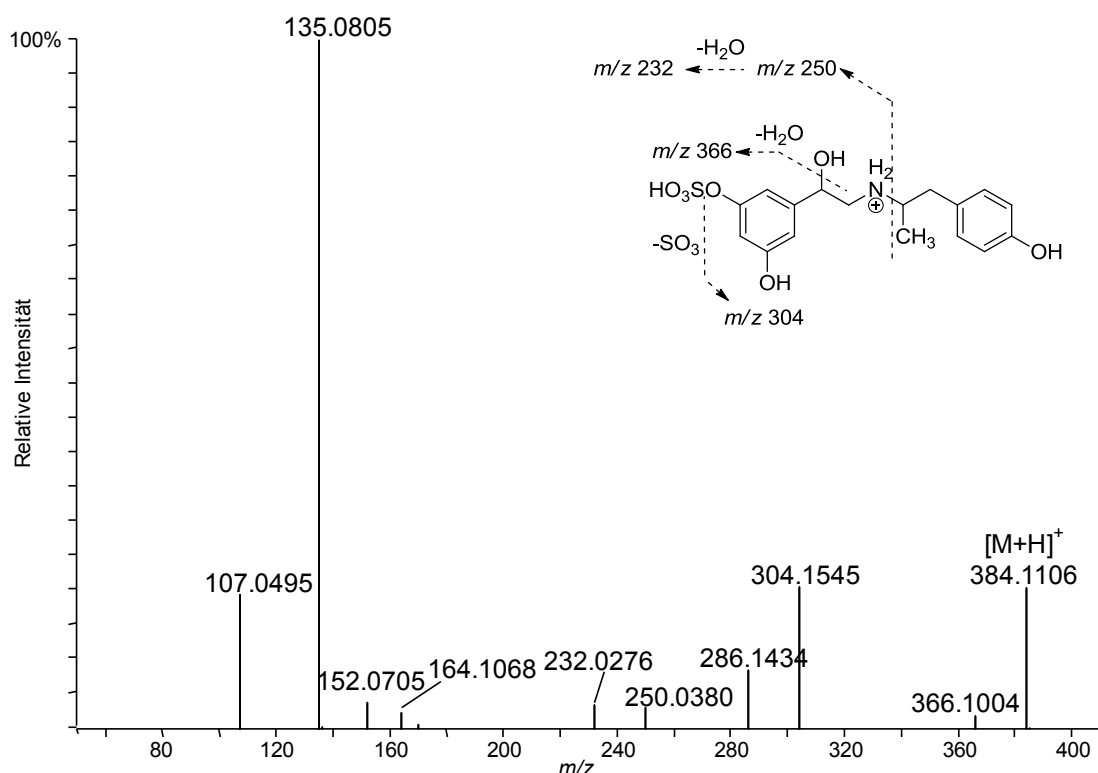


Abbildung 57 Produktionspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/Orbitrap-MS) des protonierten Quasimolekülions  $[M+H]^+$  von Fenoterol-*mono*-Sulfokonjugat 2 (**9-Sulf2**, CE 19 eV)

**9-Sulf3** erscheint in den MRM-Experimenten (Abbildung 45, Kapitel 4.1.5.3) ebenfalls bei den Ionenübergängen vom Quasimolekülion  $m/z$  384, allerdings mit einer sich von **9-Sulf1** und **9-Sulf2** wesentlich unterscheidenden Retentionszeit. Es wurde angenommen, dass es sich um ein *bis*-Sulfokonjugat handelt, welches durch *in source*-Eliminierung einer  $SO_3$ -Gruppe bei  $m/z$  384 detektiert wird (Produktions-Massenspektrum siehe Abbildung 58). Um diese Vermutung zu bestätigen wurde ein EPI-Spektrum von **9-Sulf3** ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  464) aufgenommen. Da dies nicht erfolgreich war, wurde ein *precursor ion scan* des Hauptfragments  $m/z$  286 durchgeführt (Abbildung 59). Dabei zeigte sich, dass das *Precursor*-Ion von **9-Sulf3** als Ammoniumaddukt bei  $m/z$  481 detektiert wird, was mittels  $MS^3$ -Experimenten (LC-*Triple* Quadrupol-LIT-Instrument; Ionenübergang 481-384) bestätigt wurde (Abbildung 60).

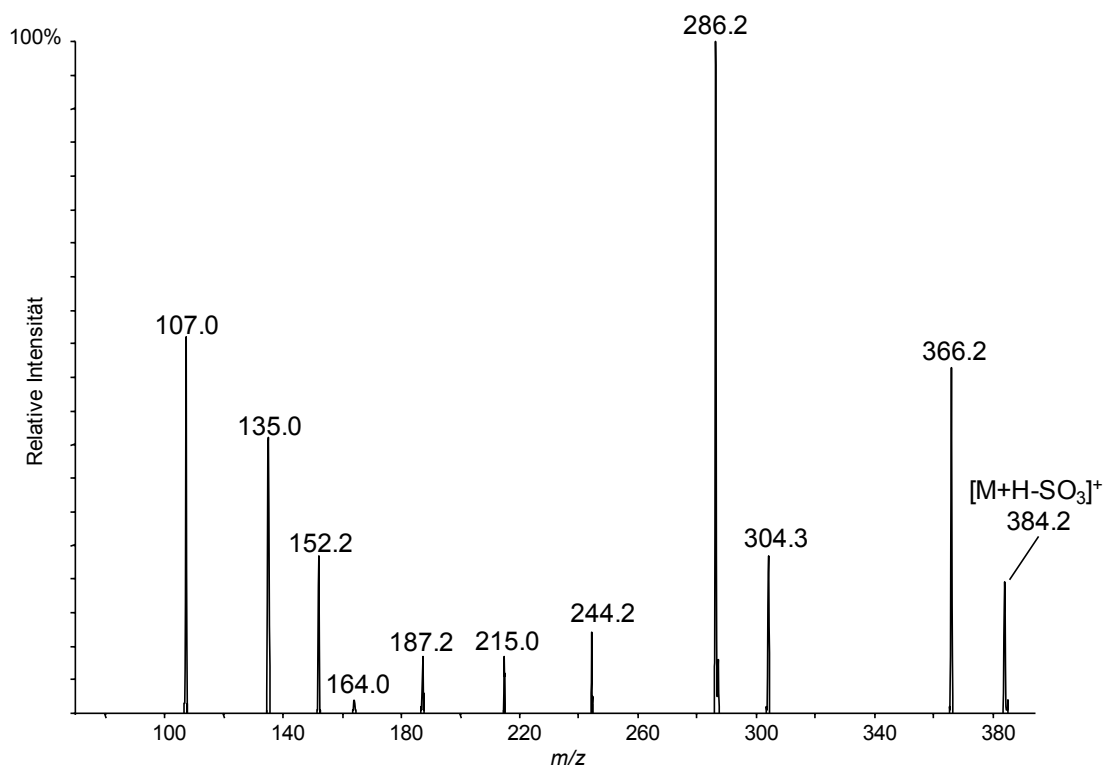


Abbildung 58 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H-SO_3]^+$  von Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat (**9-Sulf3**, CE 30 eV)

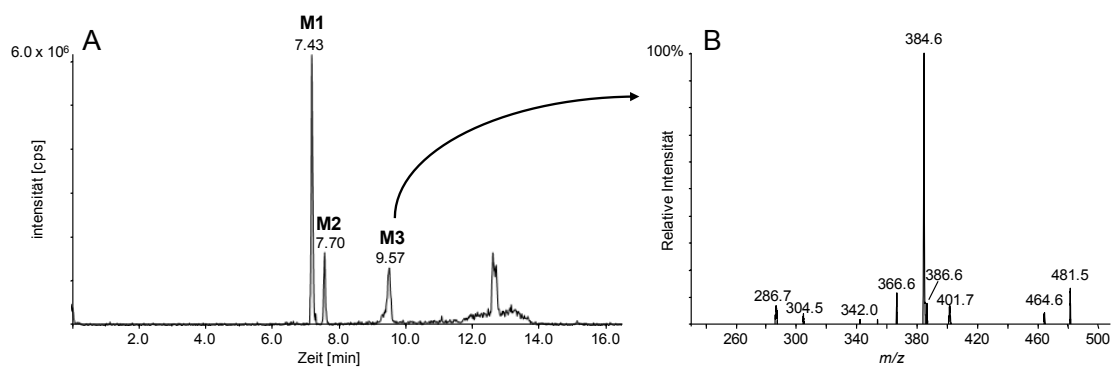


Abbildung 59 (A) Ionenchromatogramm des precursor ion scans von  $m/z$  286 (QTRAP) und (B) das resultierende Produktionenspektrum von Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat (**9-Sulf3**) als Ammoniumaddukt (LC-MS/MS, CE 30 eV,  $m/z$  481,5)

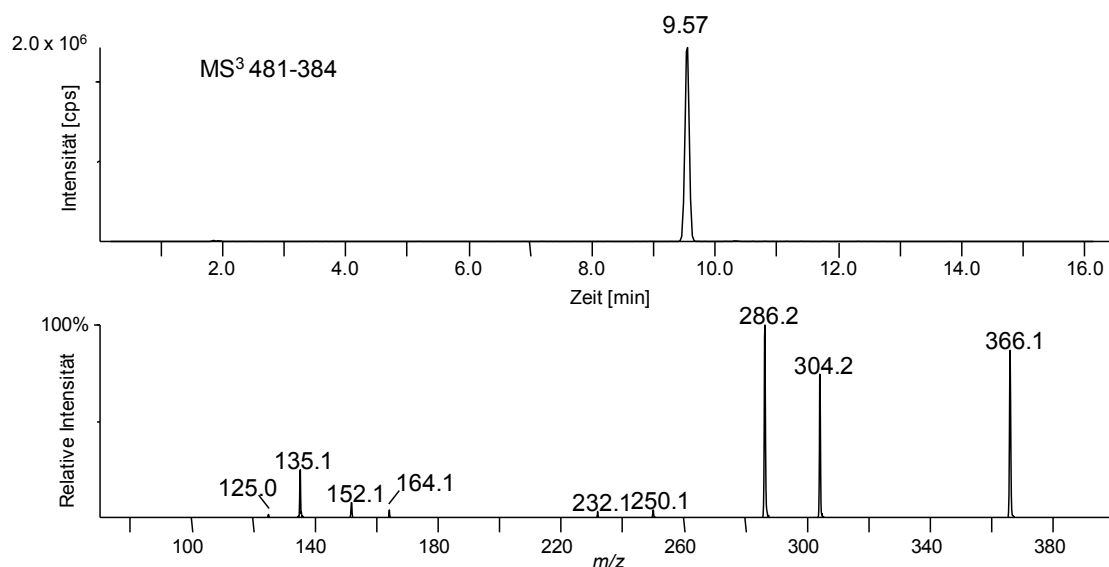


Abbildung 60 Ionenchromatogramm des  $MS^3$ -Experiments (QTRAP) des Ionenübergangs 481-384 (oben) und das resultierende Produktionenspektrum (unten) von Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat (**9-Sulf3**)

Im Gegensatz zu dem LC-*Triple* Quadrupol-LIT-Instrument, ist es durch das LC-Quadrupol/Orbitrap-MS-Instrument gelungen ein Produktionenspektrum des intakten Quasimoleküls von **9-Sulf3** ( $[M+H]^+$   $m/z$  464) ohne *in source*-Fragmentierung einer  $SO_3$ -Gruppe aufzunehmen. Dies ist möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen Bauweise der ESI-Ionenquelle zu erklären. Abbildung 61 zeigt das Produktionen-Massenspektrum von **9-Sulf3**. Die Abspaltung von einmal oder zweimal  $SO_3$  (jeweils - 80 Da) führt zu den Produktionen  $m/z$  384 und  $m/z$  304. Das Produktion  $m/z$  366 entsteht durch Abspaltung von  $SO_3$  (-80 Da) und  $H_2O$  (-18 Da) vom Quasimolekülion. Die Entstehung der Produktionen  $m/z$  286,  $m/z$  135 und  $m/z$  107 sind im oberen Teil dieses Kapitels beschrieben. Die Sulfonierungsposition von **9-Sulf3** kann entweder an beiden Phenolgruppen des 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Restes lokalisiert sein, oder an einer der 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Gruppe und der 4''-Hydroxyphenyl-Position. Das HRMS-Produktionen-Massenspektrum weist die Lokalisation beider Sulfatester nicht eindeutig nach, da die Produktionen  $m/z$  250 und  $m/z$  232 auf einen Sulfatester am 3',5'-*bis*-Hydroxyphenyl-Rest hinweisen (analog zu **9-Sulf2**). Im Gegensatz dazu kann für die Bestimmung der Position des zweiten Sulfatesters das EPI-Spektrum von **9-Sulf3**  $[M+H-SO_3]^+$  herangezogen werden (siehe Abbildung 58). Die Produktionen  $m/z$  244 und  $m/z$  215 zeigen, dass die 4''-Hydroxyphenyl-Position verestert ist (analog zu **9-Sulf1**).

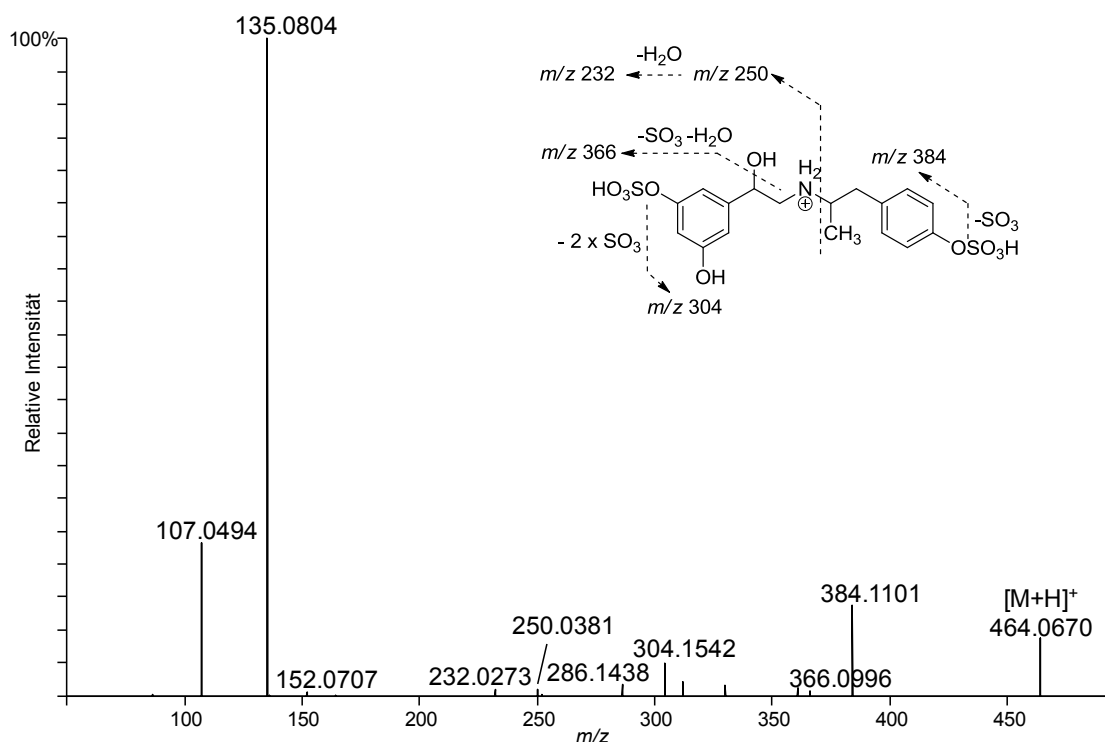


Abbildung 61 Produktionenspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Fenoterol-*bis*-Sulfokonjugat (**9-Sulf3**, CE 19 eV)

#### 4.2.1.4 Salbutamol-Sulfokonjugat

Die hochaufgelösten, massengenen Produktionenspektren von Salbutamol (**10**) und seinem Sulfokonjugat (**10-Sulf**) sind in Abbildung 62 und Abbildung 63 dargestellt. Die Elementarzusammensetzung der protonierten Moleküle von **10** und **10-Sulf** und die resultierenden Produktionen, ermittelt durch hochaufgelöste, massengenaue  $MS^2$ -Experimente, sind in Tabelle 5 zusammengefasst (LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS).

Das HRMS-Produktionen-Massenspektrum von **10-Sulf** (Abbildung 63,  $m/z$  320,12) zeigt einen Verlust von 80 Da ( $SO_3$ ) und bildet das Produktion bei  $m/z$  240, was mittels HRMS bestätigt wurde (Tabelle 5). Die nachfolgende Elimination von  $H_2O$  (-18 Da) und Isobuten (-56 Da) führt zu den Produktionen  $m/z$  222 und  $m/z$  166 (entspricht  $C_9H_{12}O_2N$ ). Das Produktion  $m/z$  148 entsteht durch anschließende Eliminierung eines weiteren  $H_2O$ -Moleküls. Diese drei Produktionen ( $m/z$  222,  $m/z$  166 und  $m/z$  148) wurden bereits in der Literatur für die Fragmentierung von freiem Salbutamol (HRMS-Produktionen-Massenspektrum  $m/z$  240,16, siehe Abbildung 62) beschrieben.<sup>91</sup> Die Eliminierung von

SO<sub>3</sub> (-80 Da) und der anschließende Verlust von zwei Molekülen H<sub>2</sub>O (zweimal -18 Da) resultiert in der Produktion bei  $m/z$  204.

Tabelle 5 Elementare Zusammensetzung und resultierende Produktionen der protonierten Moleküle von Salbutamol und seinem Sulfokonjugat ermittelt durch HRMS-Experimente (MS<sup>2</sup>, LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS)

Verbindung	Vorläuferion ( $m/z$ )	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	CE (eV)	Produktion ( $m/z$ )	Elementare Zusammensetzung (exp.)	Fehler (ppm)	Abspaltung
<b>10</b> (RT 3,16 min)	240,1590	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> N	-0,4	10	222,1481	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> N	-3,3	H <sub>2</sub> O
					204,1382	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ON	-0,1	2 x H <sub>2</sub> O
					166,0858	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N	-0,4	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> , H <sub>2</sub> O
					148,0752	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ON	-0,5	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> , 2 x H <sub>2</sub> O
<b>10-Sulf</b> (RT 3,46 min)	320,1151	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> NS	-3,6	10	240,1589	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> N	-2,1	SO <sub>3</sub>
					222,1484	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> N	-2,1	H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					204,1378	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> ON	-2,4	2 x H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					166,0860	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N	-1,3	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> , H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>
					148,0752	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ON	-3,4	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> , 2 x H <sub>2</sub> O, SO <sub>3</sub>

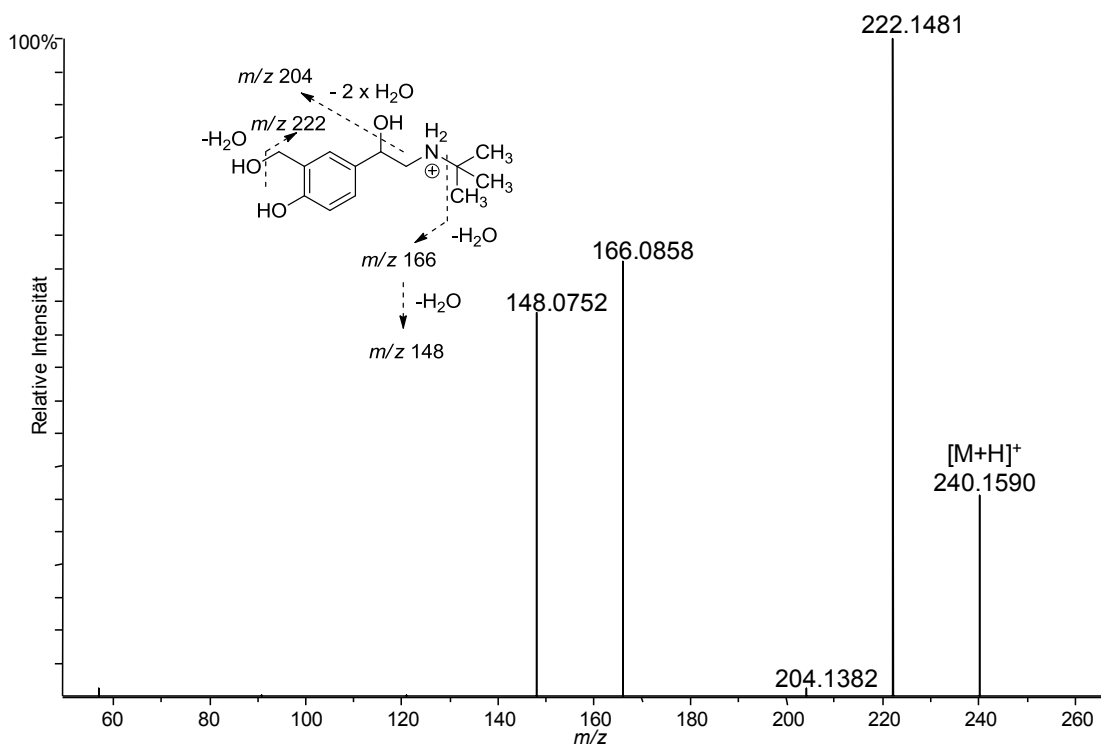


Abbildung 62 Produktionspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/ Orbitrap-MS) des protonierten Quasimoleküls [M+H]<sup>+</sup> von Salbutamol (**10**, CE 15 eV)

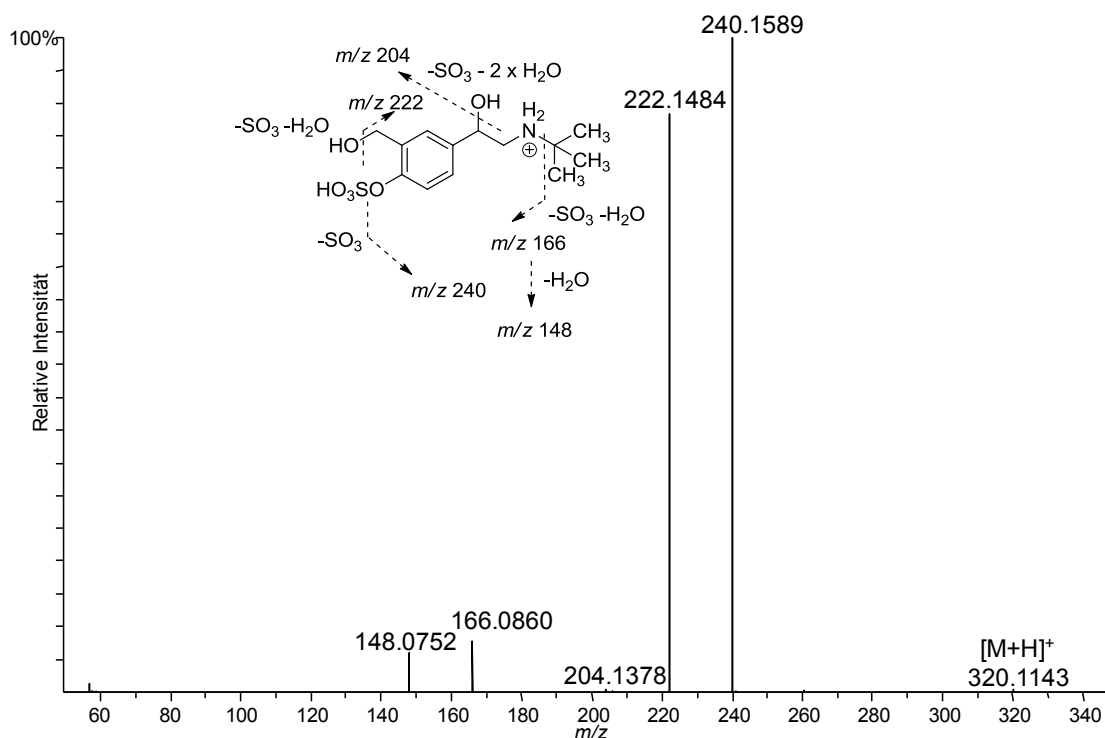


Abbildung 63 Produktionspektrum (HRMS; LC-Quadrupol/Orbitrap-MS) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Salbutamol-Sulfokonjugat (**10-Sulf**, CE 15 eV)

## 4.2.2 NMR-Spektroskopie

### 4.2.2.1 Octopamin-Sulfokonjugat

Die aromatischen Protonen von unkonjugiertem Octopamin (**2**) ergeben im  $^1H$ -NMR-Spektrum zwei Signale die jeweils den beiden *ortho*-Protonen und den beiden *meta*-Protonen zugeordnet werden können ( $\delta = 7,36$ - $7,37$  ppm, 2H, *Multiplett* und  $\delta = 7,48$ - $7,50$  ppm, 2H, *Multiplett*). Die Aufspaltung des Kopplungsmusters der aromatischen Protonen durch eine Sulfonierung in *para*-Position ist nicht zu erwarten, da die *ortho*- und *meta*-Protonen jeweils magnetisch nicht unterscheidbar bleiben. Die Sulfonierung in *para*-Position führt allerdings zu einem Entschirmen der aromatischen Protonen, die somit tieffeldverschoben erscheinen. So kann durch das NMR-Experiment bestätigt werden, dass der Sulfatester (**2-Sulf**) an der phenolischen Gruppe lokalisiert ist. Ein Sulfatester an der benzyliischen Hydroxygruppe würde die chemische Verschiebung nur in geringfügiger Weise beeinflussen. Die  $^1H$ -NMR-Spektren von **2** und **2-Sulf** sind in Abbildung 89 und Abbildung 90 (siehe Anhang, Kapitel 7.3, Seite 148) abgebildet.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): phenolisch sulfokonjugiertes Octopamin (**2-Sulf**):  $\delta$  3,22-3,35 (*m*, 2 H), 5,04 (*dd*, 1 H), 7,36-7,37 (*m*, 2 H), 7,48-7,50 (*m*, 2 H); freies Octopamin (**2**):  $\delta$  3,20-3,29 (*m*, 2 H), 4,92 (*dd*, 1 H), 6,93-6,94 (*m*, 2 H), 7,31-7,33 (*m*, 2 H).

#### 4.2.2.2 Terbutalin-Sulfokonjugat

Die aromatischen Protonen von unkonjugiertem Terbutalin (**7**) ergeben im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwei Signale, welche jeweils dem *para*-Proton ( $\delta = 6,10$  ppm, 1H, *Triplet*) und den beiden (magnetisch äquivalenten) *ortho*-Protonen ( $\delta = 6,25$  ppm, 2H, *Dublett*) zugeordnet werden können. Die Sulfonierung von einer der beiden phenolischen Gruppen führt zu einem Entschirmen der aromatischen Protonen, die somit tieffeldverschoben bei höherer ppm erscheinen. Außerdem führt dies zu magnetisch unterscheidbaren *ortho*-Protonen. So können drei aromatische Signale (ein *Multiplet* bei  $\delta = 6,57$  ppm und zwei *Triplets* bei jeweils  $\delta = 6,45$  ppm und  $\delta = 6,52$  ppm) für **7-Sulf1** im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum beobachtet werden. Da eine Derivatisierung der benzyliischen Hydroxygruppe das aromatische Kopplungsmuster im Vergleich zum Aglykon nicht beeinflussen würde, kann geschlussfolgert werden, dass **7-Sulf1** an einer der beiden phenolischen Gruppen verestert ist. Die *mono*-Sulfonierung beider phenolischen Gruppen ergibt das gleiche Produkt, da die Bindung zwischen Phenylrest und aliphatischer Seitenkette frei drehbar ist. Die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **7** und **7-Sulf1** sind in Abbildung 91 und Abbildung 92 (siehe Anhang, Kapitel 7.3, Seite 149) abgebildet.

$^1\text{H-NMR}$  ( $d_6\text{-DMSO}$ ): phenolisch sulfokonjugiertes Terbutalin (**7-Sulf1**):  $\delta$  1,01 (*s*, 9 H), 4,34 (*dd*, 1 H), 6,44 (*t*, 1 H), 6,51 (*t*, 1 H), 6,56 (*m*, 1H); freies Terbutalin (**7**):  $\delta$  1,20 (*s*, 9 H), 2,69 (*m*, 1 H), 2,83 (*dd*, 1 H), 4,65 (*dd*, 1 H), 6,09 (*t*, 1 H), 6,25 (*d*, 2 H).

#### 4.2.3 Schlussfolgerung der Charakterisierung der Referenzsubstanzen

Es ist gelungen, die Sulfokonjugate von Etilefrin (siehe Kapitel 4.1.1), Octopamin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol zu charakterisieren. Dabei stellen die phenolisch veresterten Sulfokonjugate die Metaboliten dar, die nach oraler Aufnahme der Aglyka im Urin ausgeschieden werden und somit die gewünschten Produkte sind. Die Produkte wurden ausführlich durch HRMS und LC-(ESI)-MS/MS charakterisiert. Die phenolisch



veresterten Sulfokonjugate von Octopamin und Terbutalin wurden außerdem durch  $^1\text{H}$ -NMR charakterisiert. Die Produktionen-Massenspektren der Produkte lassen eine Strukturaufklärung und somit eine Bestimmung der jeweiligen Sulfonierungspositionen zu. In den Produktionen-Massenspektren von sulfokonjugierten Phenolethanolaminen kann zusätzlich zu den Produktionen, die auch im Produktionen-Massenspektrum der jeweiligen Aglyka zu sehen sind, zum einen eine Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  (-18 Da) und zum anderen eine Abspaltung von  $\text{SO}_3$  (-80 Da) vom Quasimolekülion im positiven Modus beobachtet werden. Je nach Struktur können außerdem noch sulfokonjugierte Produktionen beobachtet werden, die eine Bestimmung der Sulfonierungsposition möglich machen. Bei Sulfokonjugaten die an der benzyliischen Hydroxygruppe verestert sind, ist die Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  nicht zu beobachten, wohingegen eine Abspaltung von  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (-98 Da) vom Quasimolekülion zu beobachten ist. In den Produktionen-Massenspektren von mehrfach sulfonierten Phenolethanolaminen kann man in der Regel beide Abspaltungen beobachten. Mit Hilfe des Vergleichs der Produktionen-Massenspektren der jeweiligen Aglyka lassen sich Produktionen identifizieren, die eine Massenverschiebung von 80 Da ( $\text{SO}_3$ ) aufweisen. Anhand dieser kann auch die Sulfonierungsposition, beziehungsweise können auch die Sulfonierungspositionen von Strukturen bestimmt werden, die mehrere Phenol-Gruppen aufweisen.

Die Sulfonierungsposition kann anhand der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie jeweils nur im Vergleich zu einem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des jeweiligen Aglykons zugeordnet werden. Je nach Substituentenmuster am Phenylring kann sich durch Sulfonierung des Phenols entweder das Kopplungsmuster der aromatischen Protonen verändern (bei *mono*-Phenolen) oder aber es findet lediglich eine Tieffeldverschiebung der aromatischen Protonen durch das Entschirmen dieser durch den Sulfatester statt (bei *poly*-Phenolen). Die Sulfonierung der benzyliischen Hydroxygruppe hat keinen Einfluss auf die aromatischen Protonen.

Somit konnte die Sulfonierungsposition der erhalten Sulfokonjugate eindeutig für Octopamin und Terbutalin und mit hoher Sicherheit für Etilefrin, Fenoterol und Salbutamol zugeordnet werden.

## 4.3 Ausscheidungsstudien

### 4.3.1 Octopamin

Die Ergebnisse der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Validierungsparameter der Methode zum Nachweis von Octopamin in Ausscheidungsproben sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Unter Voraussetzung eines Signal-Rausch-Verhältnisses ( $S/N$ )  $\geq 3:1$  wurden LODs in Urin von 300 ng/mL für **2-Sulf** und 10 ng/mL für **2** bestimmt. Die Wiederfindung für das freie Octopamin (**2**) war mit 93 % zufriedenstellend, während die von **2-Sulf** mit 3 % unbefriedigend war. Durch die hohe Polarität von **2-Sulf** hat der Analyt nur eine geringe Retention auf der Festphase. Allerdings zeigten Versuche mit anderen Festphasen (PAD und Anionenaustauscher) schlechtere Ergebnisse. Die Ermittlung der Präzision ergab relative Standardabweichungen von weniger als 20 %, lediglich bei der niedrigen Konzentration des Sulfokonjugates lag die relative Standardabweichung abweichend höher. Die Untersuchung der Spezifität zeigte, dass in ca. 10 % der Urinproben ein interferierendes Signal im Chromatogramm des Sulfokonjugates zur entsprechenden RT zu beobachten ist. Anhand der relativen Intensitäten verschiedener diagnostischer Ionenübergänge konnte aber ausgeschlossen werden, dass es sich um endogenes **2-Sulf** handelt. Desweiteren zeigte sich nach einer chemischen Hydrolyse, dass die unbekannte, nun dekonjugierte Substanz ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  154) eine von Octopamin deutlich abweichende RT aufwies. So konnte im Rahmen dieser Studie bestätigt werden, dass weder endogenes **2** noch **2-Sulf** ausgeschiedenen wird, was in der Literatur diskutiert wurde (siehe Kapitel 2.1.3.2).<sup>23,24</sup>

Tabelle 6 Validierungsparameter für die Probenvorbereitung der Octopamin-Ausscheidungsurinproben

	Wiederfindung	LOD ( $S/N \geq 3$ ) [ng/mL]	Präzision (relative Standardabweichung)		
			niedrig (0,5 µg/mL)	mittel (2,0 µg/mL)	hoch (4,0 µg/mL)
Octopamin-Sulfokonjugat	3 %	300	30 %	11 %	20 %
Octopamin	93 %	10	4 %	3 %	4 %

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass für die Bestimmung des sehr polaren **2-Sulf** in Zukunft eine verbesserte Probenvorbereitung erfolgen sollte. Die Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion ist für **2** gut geeignet, bietet jedoch für das Sulfokonjugat nicht die optimale Retention. Aufgrund der zukünftig geplanten Direktinjektion von Urinproben, die sich durch immer empfindlicher werdende Massenspektrometer anbietet, würde sich diese Problematik jedoch nicht mehr stellen. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung von Octopamin-Ausscheidungsstudien ein solches Gerät noch nicht zur Verfügung stand und **2** in hohem Ausmaß sulfokonjugiert ausgeschieden wird, wurde die Festphasenextraktion dennoch als Probenvorbereitung für die Ausscheidungsstudie benutzt. Für eine quantitative Aussage bezüglich des Ausscheidungsprofils von **2-Sulf** sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Abbildung 64 zeigt das extrahierte Ionenchromatogramm (LC-MS/MS) der Ionenspur von **2**, **2-Sulf** und d<sub>3</sub>-Octopamin (ISTD) von einer Urinprobe 3 h nach oraler Einnahme von 150 mg Octopamin. **2-Sulf** wird in einem höheren Ausmaß ausgeschieden als **2**. Das gleiche lässt sich bei den Exkretionsraten der beiden Substanzen beobachten (Abbildung 65 und Abbildung 66). Die höchste Exkretionsrate von **2-Sulf** (530 µg/min) wird nach 70 min erreicht, während das Aglykon nur eine sehr geringe Exkretionsrate besitzt. Hier wird das Maximum von 2 µg/min nach 2 h erreicht.

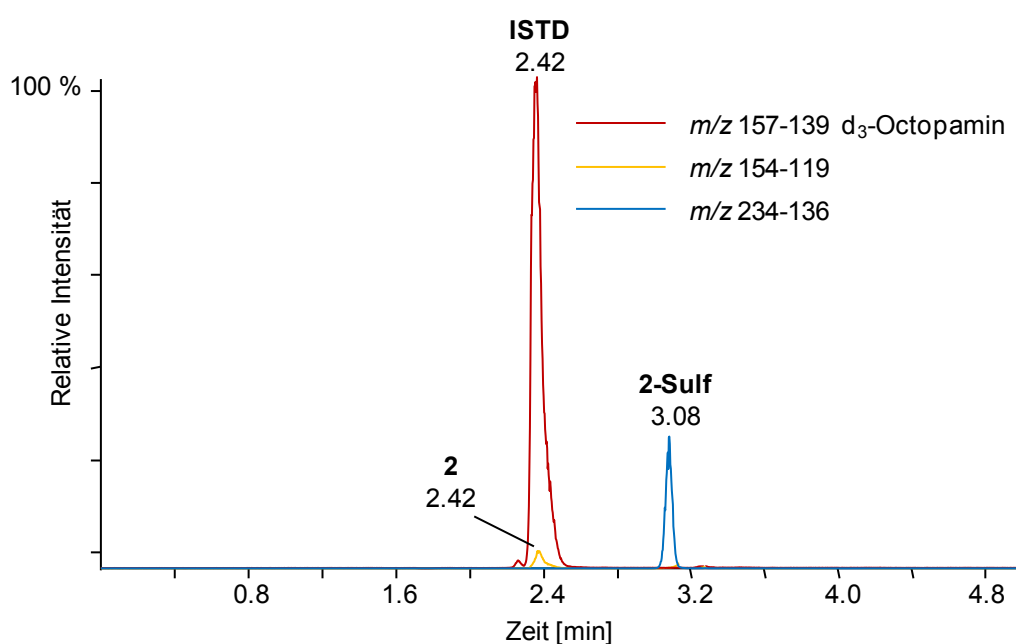


Abbildung 64 Kombiniertes, extrahiertes Ionenchromatogramm (LC-MS/MS; MRM-Modus) einer Urinprobe nach oraler Einnahme von Octopamin (Sammelzeitraum = 0-3 h)

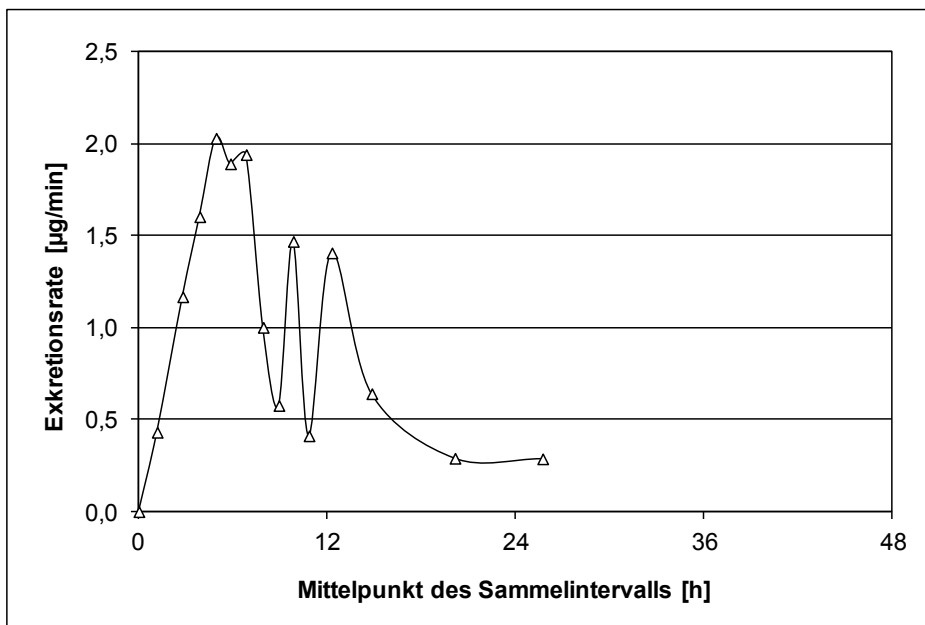


Abbildung 65 Ausscheidungsprofile von freiem Octopamin (2) nach oraler Aufnahme von 150 mg Octopamin

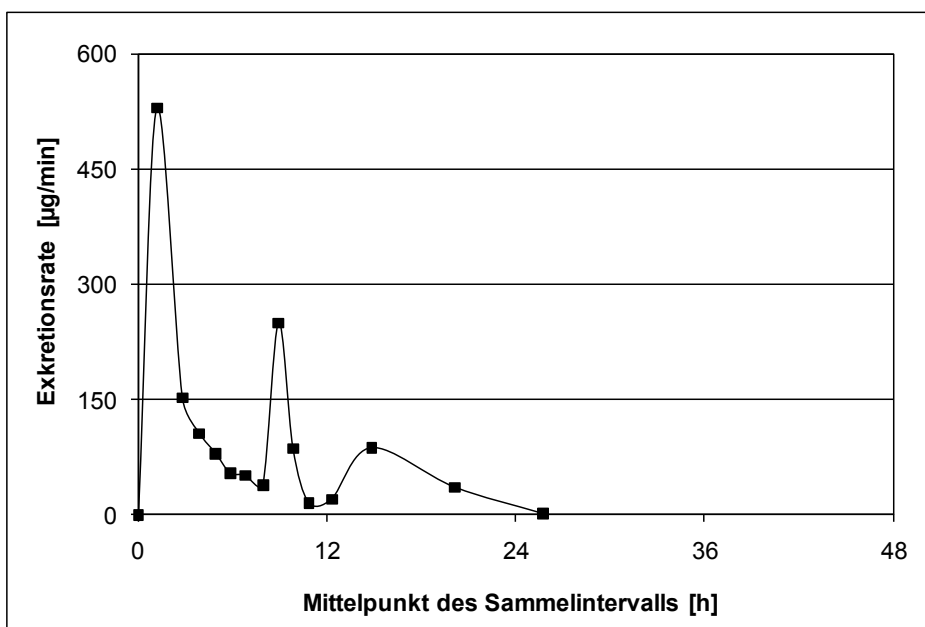


Abbildung 66 Ausscheidungsprofil von Octopamin-Sulfokonjugat (2-Sulf) nach oraler Aufnahme von 150 mg Octopamin

### 4.3.2 Terbutalin

In der Ausscheidungsstudie mit Terbutalin konnte außer dem unverändert ausgeschiedenen Terbutalin (**7**) auch ein *mono*-Sulfokonjugat detektiert werden. Die Festphasenextraktion die zur Probenvorbereitung der Terbutalin-Ausscheidungsproben benutzt wurde (siehe Kapitel 3.2.2), ist eine geeignete Methode, um die Analyten nachzuweisen. Der gewählte ISTD *p*-Hydroxyephedrin-Sulfokonjugat erwies sich als gut geeignet. Der diagnostische Ionenübergang, der für den ISTD ( $m/z$  262-164; RT 4,72 min) benutzt wurde, ist auf einen Neutralverlust von H<sub>2</sub>O und SO<sub>3</sub> (-18 Da und -80 Da) zurückzuführen. Das resultierende Produktion  $m/z$  164 generiert Produktionen, die bereits für unkonjugiertes *p*-Hydroxyephedrin beschrieben wurden.<sup>128</sup> Die Eliminierung eines Methylradikals (-15 Da) resultiert in dem Produktion  $m/z$  149 und der Neutralverlust von Methylamin (-31 Da) produziert das Produktion bei  $m/z$  133 (Produktionen-Massenspektrum siehe Anhang, Kapitel 7.2, Abbildung 85, Seite 146).

Das Produktionen-Massenspektrum und die RT des ausgeschiedenen Sulfokonjugates von Terbutalin sind identisch mit denen von **7-Sulf1**, welches als phenolisch sulfokonjugiert identifiziert wurde. Da alle Produktionen von **7-Sulf2** auch im Produktionen-Massenspektrum von **7-Sulf1** vorhanden sind, wurde die RT der Sulfokonjugate als zusätzlicher Entscheidungsparameter hinzugezogen, um die Anwesenheit von **7-Sulf2** in der Terbutalinausscheidungsstudie auszuschließen. Nur ein Sulfokonjugat mit der RT von 6,32 min (welches **7-Sulf1** zuzuordnen ist) wurde detektiert (Abbildung 67). Ein phenolisch verestertes Sulfokonjugat als Metabolit von Terbutalin wurde auch in den bisher veröffentlichten Studien zum Metabolismus von Terbutalin beschrieben. bisher wurde allerdings die Struktur des Sulfokonjugates noch nicht aufgeklärt.<sup>26,28</sup>

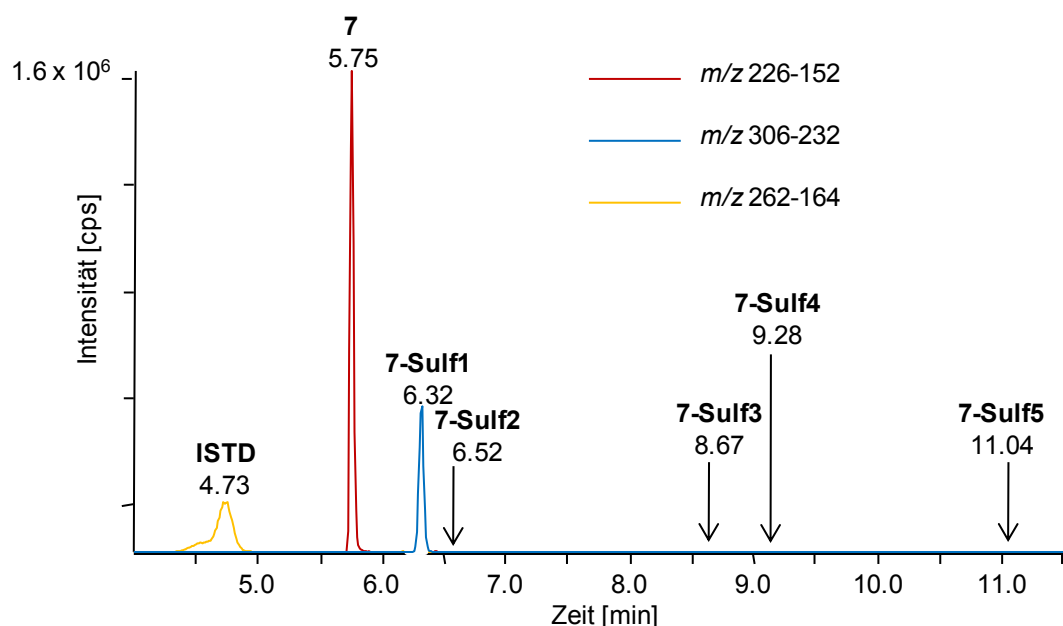


Abbildung 67 Kombinierte, extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus) einer Urinprobe eines Probanden (weiblich, 26 Jahre alt, Mittelpunkt des Sammelintervalls 4 h) nach oraler Einnahme von Terbutalin. Nur Terbutalin (**7**) und sein *mono*-Sulfokonjugat 1 (**7-Sulf1**) werden detektiert. Die erwarteten RTs für das *mono*-Sulfokonjugat 2 (**7-Sulf2**), die *bis*-Sulfokonjugate **7-Sulf3** und **7-Sulf4** und das *tris*-Sulfokonjugat (**7-Sulf5**) wurde aus den Syntheseexperimenten zugeordnet

Die Eliminationskinetik von **7** und **7-Sulf1** der drei Probanden ist in Abbildung 68 und Abbildung 69 abgebildet. **7-Sulf1** konnte für 2 bis 4 Tage in den Urinproben nachgewiesen werden, **7** für etwa 4 bis 5 Tage. 24 h nach der Einnahme bis zum Ende der Nachweisbarkeit von **7** (Detailansicht 24 bis 120 h in Abbildung 68) reicht die Konzentration von durchschnittlich 0,91 µg/mL bis hinunter auf 0,06 µg/mL, was noch über dem LOQ liegt. bisher wurden keine Studien zur Eliminationskinetik von unkonjugiertem Terbutalin veröffentlicht, aber nach Einnahme von 0,1 mg Tritium-markiertem Terbutalin konnte dieses für 24 h in Plasma nachgewiesen werden. Dabei wurde die Gesamtmenge (unkonjugiertes und konjugiertes Terbutalin) über 72 h nachgewiesen.<sup>26</sup> Die Exkretionsrate des Ausscheidungsprofils (siehe Abbildung 69) von sulfokonjugiertem Terbutalin errechnet sich aus der relativen Signalfäche, da im Rahmen dieser Arbeit für eine Quantifizierung nicht ausreichend Referenzsubstanz hergestellt werden konnte. Deswegen wurde auch keine Verhältnisgröße zwischen konjugiertem und freiem Terbutalin berechnet. Eine direkte Bestimmung des Sulfokonjugates wurde bisher nicht veröffentlicht und konnte somit nicht mit den vorliegen Daten verglichen werden. Das Exkretionsprofil von freiem Terbutalin stimmt

aber mit bisherigen Veröffentlichungen überein. Da die meisten Kinetikstudien in Plasma oder Serum bestimmt wurden, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Der anhand der Urinproben ermittelte Kurvenverlauf des Exkretionsprofils stimmt aber mit den Literaturdaten des in Serum bestimmten Terbutalins überein. Die Höchstwerte, die in Serum nach oraler Gabe von Terbutalin bestimmt wurden, wurden nach 1 bis 3 h erreicht.<sup>28</sup> Die in dieser Studie erreichten Maximalkonzentrationen in Urin wurden nach 4 h nachgewiesen. Abbildung 67 zeigt die extrahierten Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Ionenübergänge aller synthetisierten Sulfokonjugate, von unkonjugiertem Terbutalin und vom ISTD. Das *mono*-Sulfokonjugat **7-Sulf2**, ein *bis*- oder *tris*-Sulfokonjugat von Terbutalin (**7-Sulf3** bis **7-Sulf5**) konnte nach oraler Einnahme von Terbutalin nicht im Urin nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde auf eine weitgehendere Charakterisierung dieser Konjugate mittels HRMS- und NMR-Techniken verzichtet. Ein Glucuronsäurederivat, welches in früheren Studien beschrieben wurde, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Der Ionenübergang, der hier für den Nachweis gewählt wurde (Abspaltung von 176 Da, was Anhydroglucuronsäure entspricht), ist für Glucuronsäurederivate von phenolischen Verbindungen nach CID des protonierten Quasimoleküliions charakteristisch.<sup>82</sup> Der Nachweis eines glucuronidierten Terbutalinderivats in einer früheren Studie<sup>30</sup> kann durch eine unspezifische Hydrolyse der dort benutzten  $\beta$ -Glucuronidase mit Sulfokonjugaten und weniger sensitive Messmethoden bedingt sein. Eine nähere Untersuchung zur Spaltung von Terbutalinkonjugaten durch verschiedene Enzyme unterschiedlicher Herkunft bestätigen diese Vermutung.<sup>28</sup>

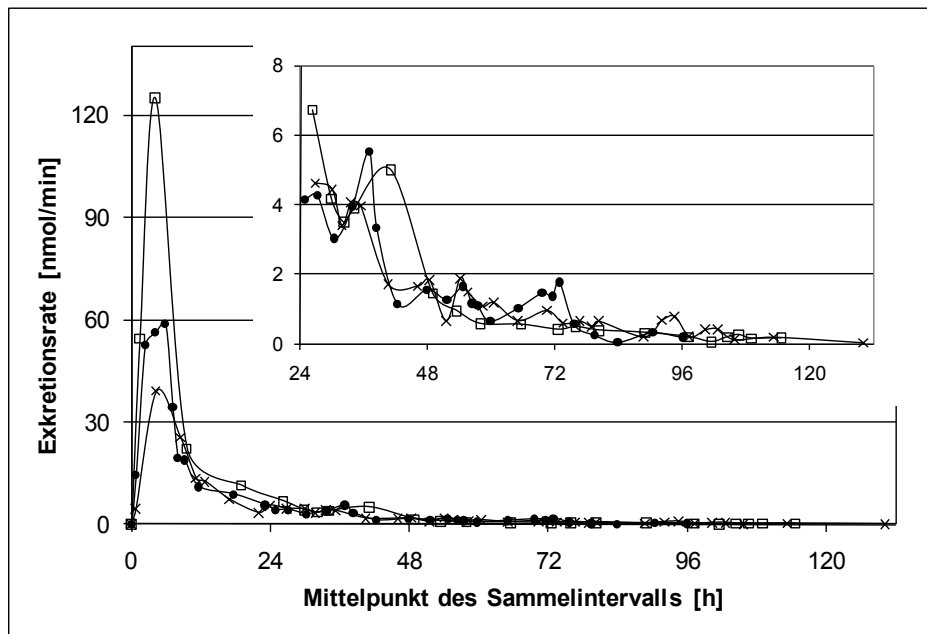


Abbildung 68 Ausscheidungsprofile von freiem Terbutalin (dargestellt als Exkretionsrate in nmol/min) von Probanden 1 ( $\square$ ); 2 (X); 3 ( $\bullet$ ). Die Detailansichten zeigen die Ausscheidungsprofile vom Zeitpunkt 24 h nach Einnahme bis zum Ende der Ausscheidung.

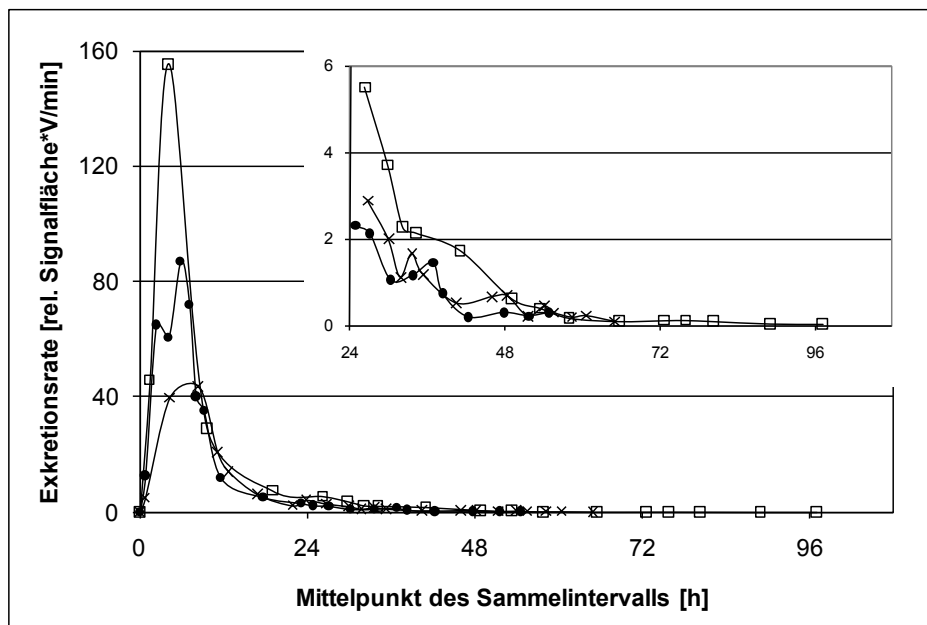


Abbildung 69 Ausscheidungsprofile von Terbutalin *mono*-Sulfokonjugat **7-Sulf1** (dargestellt als Exkretionsrate in relativer Signalfäche\*V/min) von Probanden 1 ( $\square$ ); 2 (X); 3 ( $\bullet$ ). Die Detailansichten zeigen die Ausscheidungsprofile vom Zeitpunkt 24 h nach Einnahme bis zum Ende der Ausscheidung.



### 4.3.3 Fenoterol

Die Ausscheidungsstudien zeigten, dass alle *in vitro* synthetisierten Sulfokonjugate von Fenoterol auch *in vivo* nachgewiesen werden können. Die Retentionszeiten und die Produktionenspektren entsprachen denen der synthetisierten Konjugate.

Nach Inhalation von Fenoterol (**9**) konnte **9-Sulf2** als Hauptmetabolit für 2,5 h Stunden nachgewiesen werden. **9-Sulf1** konnte ebenfalls für 2,5 h nachgewiesen werden, allerdings in geringerer Menge. **9-Sulf3** und **9** konnten nicht im Urin nach der inhalierten Einmaldosis nachgewiesen werden (Abbildung 70). Da die inhalative Verabreichung von **9** durch eine geringe Dosis und seinem lokalen Effekt mit geringer systemischer Absorption nur zu geringen Plasmakonzentrationen führt, ist der Nachweis von **9** und seinen Sulfokonjugaten nur für eine kurze Zeit möglich. Nach oraler Aufnahme von 10 mg Fenoterol (als Hydrobromid-Salz) wurden alle *in vitro* synthetisierten Sulfokonjugate ausgeschieden. Die *mono*-Sulfokonjugate **9-Sulf1** und **9-Sulf2** waren für 57 h bei einem konstanten Verhältnis von **9-Sulf2:9-Sulf1** von 2-3:1 nachweisbar. Das *bis*-Sulfokonjugat **9-Sulf3** war für 30 h nachweisbar. Abbildung 71 zeigt die extrahierten Ionenchromatogramme einer Urinprobe 10 h nach oraler Aufnahme von 10 mg Fenoterol aufgenommen mittels LC-MS/MS des *mono*-Sulfokonjugates ( $[M+H]^+$   $m/z$  384). Diese Ionenübergänge ermöglichen auch die Detektion des *bis*-Sulfokonjugates von Fenoterol (**9-Sulf3**), da dieses durch eine *in source*-Eliminierung einer  $SO_3$ -Gruppe bei  $m/z$  384 detektiert werden kann (siehe Kapitel 4.2.1.3).

Die in der Literatur beschriebene *in vivo*-Sulfonierung von verschiedenen  $\beta_2$ -Agonisten durch SULT1A3 im Intestinum<sup>25,129,130</sup> wurde durch diese Experimente auch für Fenoterol bestätigt, da nach oraler Aufnahme von Fenoterol im Urin zum einen **9-Sulf1** in höherem Ausmaß gebildet wird und **9-Sulf3** ebenfalls nachzuweisen war. Dies entspricht der Metabolitenbildung der *in vitro*-Experimente mit rekombinanter SULT1A3. Da die Ausscheidungsstudien nur nach einer Einmalapplikation durchgeführt wurden, können bei Langzeitanwendung die erwarteten Plasmakonzentrationen höher und die erwartete Nachweisdauer länger sein als in dieser Studie. Der Nachweis einer geringeren Menge der beiden *mono*-Sulfokonjugate von Fenoterol nach inhalativer Aufnahme von Fenoterol, ist auf die deutlich geringere Dosis im Vergleich zur oralen Applikation zurückzuführen. So konnten nach oraler Aufnahme von Fenoterol zwei *mono*-

Sulfokonjugate und zum ersten Mal ein *bis*-Sulfokonjugat von Fenoterol im Urin nachgewiesen werden.

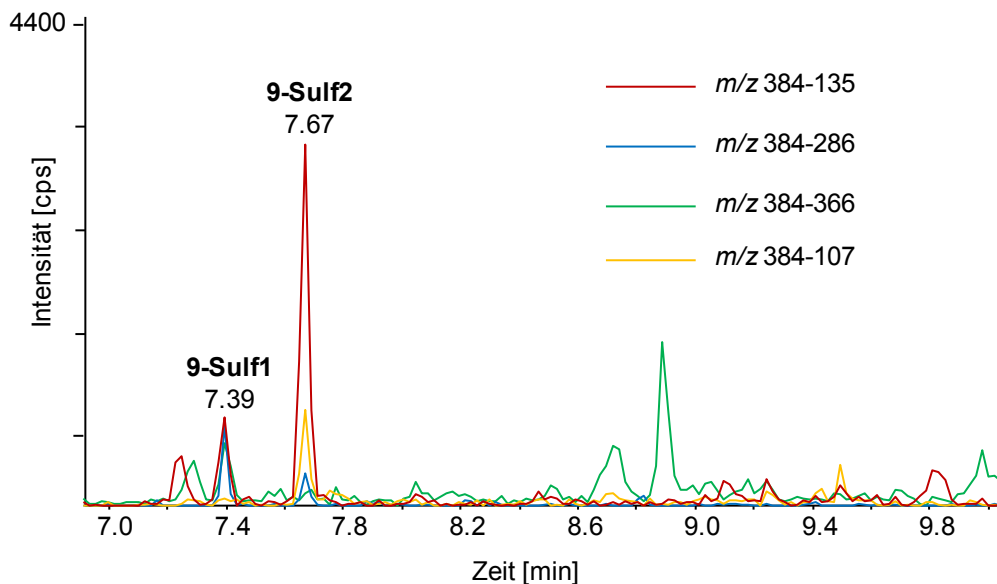


Abbildung 70 Kombinierte, extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus; CE 30 eV) eines Ausscheidungsurins (2,5 h nach inhalativer Aufnahme von 200 µg Fenoterol)

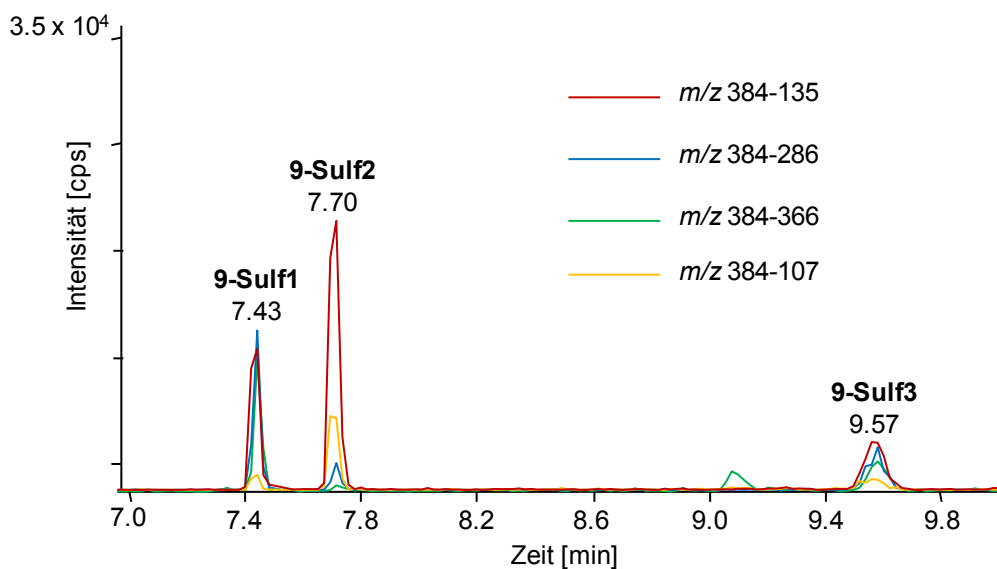


Abbildung 71 Kombinierte, extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus; CE 30 eV) eines Ausscheidungsurins (10 h nach oraler Aufnahme von 10 mg Fenoterol)

#### 4.3.4 Schlussfolgerung der Ausscheidungsstudien

Der Nachweis von sulfokonjugierten Phenoethanolaminen in Urinproben bietet die Möglichkeit von vereinfachten Screeningprozeduren. Anstatt die jeweiligen Aglyka nach Hydrolyse zu analysieren, können die Sulfokonjugate so direkt ohne zeitaufwendige Probenvorbereitung bestimmt werden, sofern bekannt ist, ob und in welchem Ausmaß diese ausgeschieden werden. Mit Hilfe der durchgeführten Ausscheidungsstudien mit Octopamin, Terbutalin und Fenoterol konnte ein wichtiger Beitrag zu dieser Fragestellung geleistet werden.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zum Nachweis von Sulfokonjugaten in Urin nach Aufnahme der jeweiligen Xenobiotika entwickelt. Dazu konnten die synthetisierten phenolisch veresterten Sulfokonjugate als Referenzmaterial benutzt werden, die vorher nicht zur Verfügung gestanden haben. Verschiedene Probenvorbereitungsmethoden wurden durchgeführt, um die Sulfokonjugate in den Urinproben der Ausscheidungsstudien nachzuweisen. Dazu wurde zur Probenvorbereitung für die Octopamin-Ausscheidungsstudie eine Festphasenextraktion mittels Oasis HLB®-Kartuschen und für die Terbutalin-Ausscheidungsstudie eine Festphasenextraktion mittels PAD-Festphase getestet. Für die Ausscheidungsstudie mit Fenoterol wurde eine Direktmessung ohne Probenvorbereitung untersucht.

Die gewählte Probenvorbereitung der Octopamin-Ausscheidungsstudie eignet sich zum Nachweis von freiem Octopamin gut; für das Sulfokonjugat ist die Wiederfindung jedoch unbefriedigend. Da Octopamin aber überwiegend sulfokonjugiert ausgeschieden wird, sollte in Zukunft der Nachweis über eine Direktinjektion der Urinproben erfolgen. Die voranschreitende Geräteweiterentwicklung und die dadurch bedingte höhere Empfindlichkeit der Messgeräte würde dies ermöglichen. Ein solches Gerät stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen der Octopamin-Ausscheidungsstudien noch nicht zur Verfügung. Mit der durchgeführten Festphasenextraktion konnten **2** und **2-Sulf** für ca. 24 h nachgewiesen werden, wobei das Sulfokonjugat eine deutlich höhere Exkretionsrate aufwies. Zusätzlich konnte im Rahmen dieser Studie bestätigt werden, dass weder endogenes Octopamin noch Octopamin-Sulfokonjugat ausgeschieden wird. Das Sulfokonjugat welches nach oraler Aufnahme von Terbutalin im Urin ausgeschieden wird, ist wie auch das Sulfokonjugat von Octopamin an der Phenolgruppe verestert. Die

RT und das Produktions-Massenspektrum sind identisch mit dem synthetisierten Referenzmaterial dieser Substanz. Es konnte für 2 bis 4 Tage neben dem unverändert ausgeschiedenen Terbutalin nachgewiesen werden, welches für 4 bis 5 Tage detektierbar war. Für zukünftige Untersuchungen über das Ausmaß der Terbutalin-Sulfokonjugat-Ausscheidung sollte eine exakte Quantifizierung der Sulfokonjugate erfolgen. Ein *bis*-Sulfokonjugat, *tris*-Sulfokonjugat oder glucuronidiertes Terbutalin konnte nicht in Ausscheidungsurinproben nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Ausscheidungsstudien von Fenoterol konnte erstmalig bewiesen werden, dass die *in vitro* generierten Sulfokonjugate von Fenoterol (zwei *mono*-Sulfokonjugate und ein *bis*-Sulfokonjugat) auch *in vivo* ausgeschieden werden. Mittels Direktinjektion der Urinproben konnten Urinproben der Fenoterol-Ausscheidungsstudie erfolgreich und gleichzeitig zeit- und kostensparend analysiert werden. Für ein Ausscheidungsprofil mit quantitativer Aussage sollte die Methode in Zukunft mit Hilfe von Referenzmaterial validiert werden. Dennoch wurde diese Methode aber für eine erste Abschätzung benutzt. Nach inhalativer Anwendung können die beiden *mono*-Sulfokonjugate **9-Sulf1** und **9-Sulf2** für 2,5 h nachgewiesen werden. Da die inhalative Verabreichung von **9** durch eine geringe Dosis und seinem lokalen Effekt mit geringer systemischer Absorption nur zu geringen Plasmakonzentrationen führt, ist der Nachweis der Sulfokonjugate nur für eine kurze Zeit möglich. Nach oraler Aufnahme hingegen ist die Nachweisdauer mit 57 h wesentlich länger. Zusätzlich ist das *bis*-Sulfokonjugat **9-Sulf3** für 30 h nachweisbar. Da die Ausscheidungsstudien nur mit einer Einmalapplikation durchgeführt wurden, können bei Langzeitanwendung die erwarteten Plasmakonzentrationen höher und die erwartete Nachweisdauer länger sein als in dieser Studie.

## 4.4 Screeningprozedur

In der Dopinganalytik werden Stimulanzien und  $\beta_2$ -Agonisten üblicherweise nach saurer Hydrolyse der Urinproben mittels LC-MS/MS analysiert.<sup>131</sup> Die bestehenden Methoden sind arbeitsaufwendig und so wurde ein alternatives Verfahren verfolgt, das ohne komplexe Probenvorbereitung auskommt und die Kombination mit dem Screening von weiteren dopingrelevanten Substanzen ermöglicht. Die meisten Diuretika,  $\beta_2$ -Agonisten und Narkotika werden neben ihren Phase-I und/oder Phase-II-Metaboliten überwiegend unverändert im Urin ausgeschieden. Zusätzlich zu diesen Substanzen, gibt es Xenobiotika die ausschließlich als Phase-II-Metaboliten ausgeschieden werden. Ziel dieser Arbeit war es, diese konjugiert ausgeschiedenen Substanzen zusammen mit frei ausgeschiedenen Substanzen in einem Screeningverfahren mittels Direktinjektion von Urinproben zu analysieren.

### 4.4.1 Probenvorbereitung

Die direkte Injektion von Urinproben bietet eine umfangreiche Anwendbarkeit der Prozedur sowie eine sehr einfache und schnelle Probenvorbereitung ohne Hydrolyse, Aufreinigung oder weitere Probenvorbereitung. So konnte zum ersten Mal in eine Direktinjektionsmethode Stimulanzien implementiert werden, die konjugiert im Urin ausgeschieden werden. Als neue Zielanalyten wurden die Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5**) und Etamivan (**6**) ohne zeitaufwendige Hydrolyseschritte analysiert.

### 4.4.2 Flüssigkeitschromatographie/ Massenspektrometrie

Die Chromatographie der Direktinjektionsmethode wurde optimiert, indem die chemische Vielseitigkeit der Analyten (vor allem das breite Spektrum der Polarität) berücksichtigt wurde. Ein Gradient der bei 100 % wässrigem Puffer (5 mM Ammoniumacetat, 1 mL/L Eisessig, pH 3,5) startet war erforderlich, um eine ausreichende Retention für die hydrophilen Verbindungen, wie z. B. die Diuretika Acetazolamid und Amilorid, zu gewährleisten (siehe Anhang, Kapitel 7.5, Abbildung 94, ab Seite 164). Um ein Blockieren der Säule durch die Direktinjektion von Urinproben zu vermeiden, wurde eine Vorsäule benutzt. Über 2000 Läufe wurden mit derselben

analytischen Säule durchgeführt, ohne dass die chromatographische Leistung gemindert wurde. Tabelle 7 (Kapitel 4.4.3) zeigt für die analysierten Sulfokonjugate, dass die relativen Retentionszeiten der Analyten stabil sind (für alle erfassten Substanzen siehe Anhang, Kapitel 7.5, Tabelle 12, ab Seite 158). Der Variationskoeffizient (CV) liegt unter 2 %, und erfüllt damit die von der WADA geforderten Kriterien.<sup>113</sup>

Die Verwendung eines modernen LC-MS-Systems (ABSciex QTRAP® 5500) bietet die Möglichkeit des schnellen Wechsels der Polarität (50 ms) und gewährleistet so die optimale Ionisierung (ESI) der unterschiedlichen Substanzen mit saurem oder basischem Charakter. Der Nachweis der Sulfokonjugate in einem breiten Spektrum von weiteren Dopingsubstanzen konnte in einem analytischen Lauf durchgeführt werden. Während die Sulfokonjugate im negativen Modus (insgesamt 41 Analyten) als deprotonierte Quasimoleküle  $[M-H]^-$  analysiert wurden, wurden 13 Analyten im positiven Modus hauptsächlich als protonierte Quasimoleküle  $[M+H]^+$  erfaßt. Nach Optimierung wurden die Ionenübergänge  $m/z$  230-106 für **4-Sulf**,  $m/z$  244-106 für **5-Sulf** und  $m/z$  302-207 für **6-Sulf** benutzt (detaillierte Bedingungen für alle Analyten siehe Anhang, Kapitel 7.5, Tabelle 11, ab Seite 154). Abbildung 72 zeigt die extrahierten Ionenchromatogramme (LC-MS/MS) der Sulfokonjugate und des ISTD Mefrusid. Die Produktionspektren der Sulfokonjugate sind in Abbildung 86 bis Abbildung 88 (siehe Anhang, Kapitel 7.2, ab Seite 146) dargestellt. Abbildung 94 (siehe Anhang, Kapitel 7.5, Seite 164) zeigt eine Qualitätskontrollprobe mit den extrahierten Ionenchromatogrammen (LC-MS/MS) aller Analyten, die in diesem umfassenden Analyseverfahren integriert sind. Alle Analyten konnten bei den geforderten Konzentrationen nachgewiesen werden.<sup>113,115</sup> Die nach Beendigung der Studie herabgesetzten MRPLs werden durch das Verfahren ebenfalls erfüllt.<sup>132</sup>

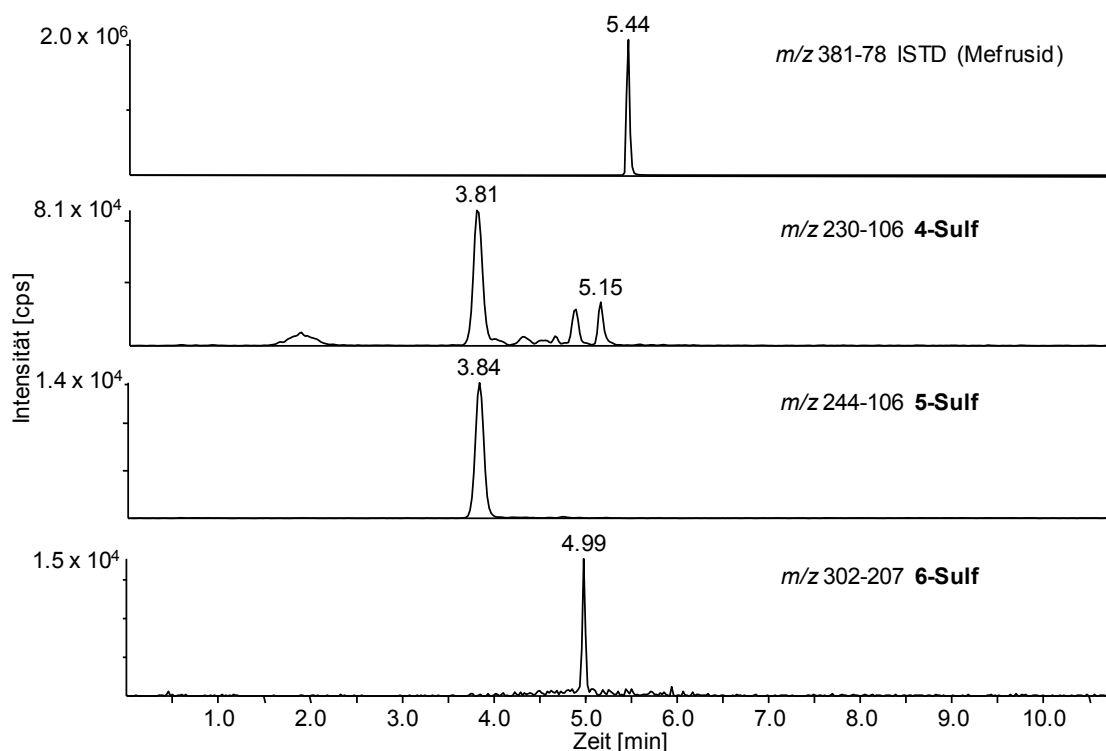


Abbildung 72 Extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus) des ISTD Mefrusid und der Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4-Sulf**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5-Sulf**) und Etamivan (**6-Sulf**) der Qualitätskontrollprobe

#### 4.4.3 Validierung

Um die Eignung der Prozedur festzustellen, wurden Spezifität, Ionensuppression/Ionenverstärkung, *intra*- und *interday*-Präzision, das LOD und die Robustheit des Verfahrens bestimmt. Bei der Untersuchung der Spezifität konnten keine signifikanten interferierenden Signale der Matrix zu den erwarteten RTs der Analyten beobachtet werden (Abbildung 73). Die Robustheit der Methode wurde als CV der relativen RTs berechnet. Stabile Retentionszeiten sind von höchster Wichtigkeit für eine zuverlässige Analyse, besonders wenn Urin direkt, ohne Probenvorbereitung, in das System injiziert wird. Die Analyse der QC-Proben über einen Zeitraum von vier Wochen ergab stabile Retentionszeiten (CV < 2 %) für alle Substanzen (siehe Anhang, Kapitel 7.5, Tabelle 12, ab Seite 158). Bei der Untersuchung der Ionensuppression bzw. Ionenverstärkung konnte keine signifikante Abnahme oder Zunahme der Elektrosprayintensität zu den erwarteten Retentionszeiten der Analyten beobachtet werden sobald die urinäre Matrix hinzugefügt wurde. Die *intra*- und *interday*-Präzision wurde bei drei verschiedenen Konzentrationen

der Analyten ermittelt. Der Variationskoeffizient war für alle Analyten kleiner als 20 %. Die bestimmten LODs der Sulfokonjugate lagen bei 25 ng/mL (zwischen 1 bis 70 ng/mL für alle Substanzen) und sind damit deutlich unter den geforderten MRPL der WADA. Es konnte gezeigt werden, dass sich das entwickelte Verfahren zum Nachweis von Sulfokonjugaten mittels Direktinjektion von Urinproben durch gute Präzision, Robustheit, eine hohe Spezifität und hervorragende Nachweisgrenzen auszeichnet. Die Validierungsergebnisse der Sulfokonjugate sind in Tabelle 7 nochmals zusammengefasst. Da die WADA nach Ende der Studie ein neues Technisches Dokument für die MRPLs veröffentlicht hat, haben sich die entsprechenden MRPLs der Substanzklassen verändert.<sup>132</sup> So ist mit Wirkung vom 01.01.2013 für Stimulanzien ein MRPL von 100 ng/mL (Ausnahme Octopamin: 100 ng/mL), für  $\beta_2$ -Agonisten ein MRPL von 20 ng/mL, für Diuretika ein MRPL von 200 ng/mL und für Narkotika ein MRPL von 50 ng/mL (Ausnahme Fentanyl 2 ng/mL) gefordert. Die Nachweisgrenzen der Sulfokonjugate liegen mit 25 ng/mL aber immer noch deutlich unter dem herabgesetzten neuen MRPL von 100 ng/mL für die Stimulanzien und erfüllen die Anforderungen.

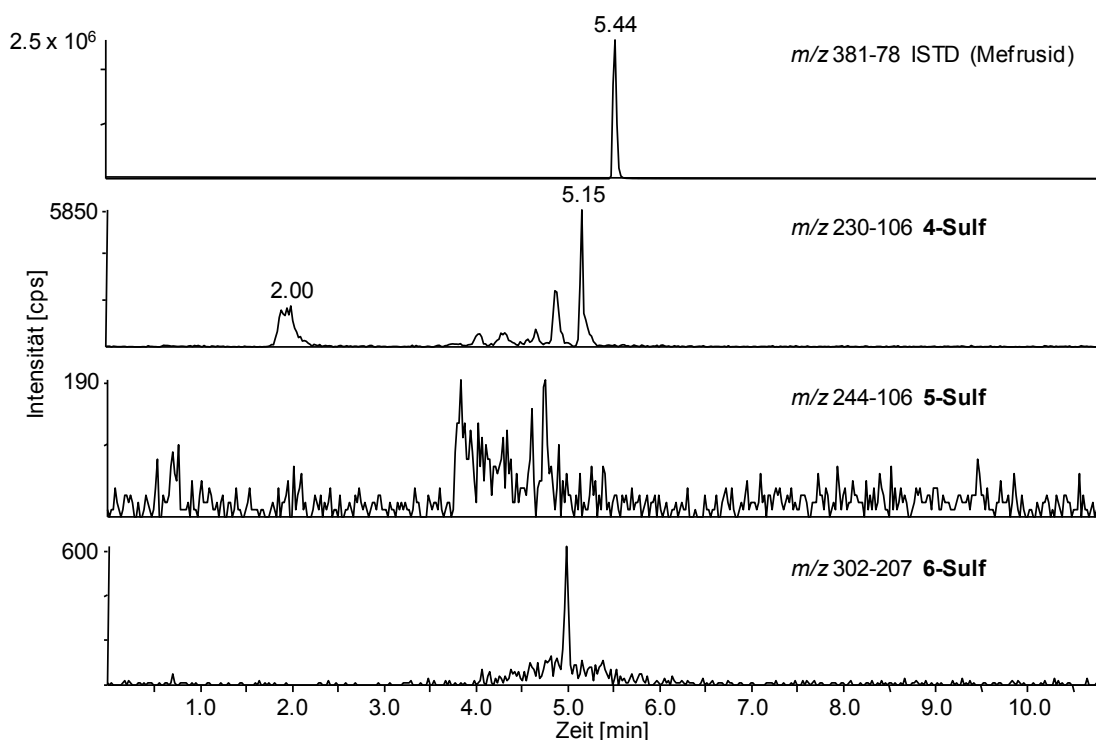


Abbildung 73 Extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus) des ISTD Mefrusid und der Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4-Sulf**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5-Sulf**) und Etamivan (**6-Sulf**) in einer Blank-Urinprobe



Tabelle 7 Validierungsergebnisse der Sulfokonjugate **4-Sulf**, **5-Sulf** und **6-Sulf** im umfassenden Screening (MRPLs nach <sup>113</sup>)

Substanz	MRPL ng/mL	LOD ng/mL	Präzi- sion	Konzentration			Intraday-Präzision			Interday-Präzision		
			RRT	ng/mL			CV ( %) (n=6/6/6)			CV ( %) (n=18/18/18)		
			CV ( %)	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>
<b>4-Sulf</b>	500	25	0,64	1000	500	100	7,92	6,49	11,12	4,35	15,88	11,73
<b>5-Sulf</b>	500	25	0,57	1000	500	100	7,00	7,64	8,64	6,99	13,34	13,45
<b>6-Sulf</b>	500	25	0,05	1000	500	100	8,82	7,77	9,56	2,69	8,51	4,95

#### 4.4.4 Anwendung auf Urinproben

Die zur Entwicklung der Prozedur verwendeten Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5**) und Etamivan (**6**) stellen Metabolite von Amphetamin, Methamphetamin und Etamivan dar. Die Metabolisierung von Etamivan und Methamphetamin (mit vorangegangener Hydroxylierung zu **5**) erfolgt hauptsächlich durch Sulfonierung. Bei Amphetamin findet die Umwandlung zum Phase-I-Metaboliten (**4**) in geringerem Ausmaß statt, womit auch das Auftreten von **4-Sulf** nur in geringer Menge auftritt.<sup>133-135</sup> *p*-Hydroxyamphetamin selber kann auch als Stimulanz benutzt werden, wobei die Metabolisierung hauptsächlich zu **4-Sulf** erfolgt.<sup>136</sup> Untersuchungen von Urinproben von Methamphetamin-Konsumenten zeigten ein *p*-Hydroxymethamphetamin-Glucuronid und **5-Sulf** als Metaboliten. Die nachgewiesene Menge an **5-Sulf** war 6- bis 10-fach höher als die von *p*-Hydroxymethamphetamin-Glucuronid. Diese Daten lassen vermuten, dass das **5-Sulf** der hauptsächliche Phase-II-Metabolit von Methamphetamin ist.<sup>110</sup> Das Sulfokonjugat von Etamivan (**6-Sulf**) konnte in Ausscheidungsurinproben 6 bis 12 h nach oraler Applikation von 40 mg Etamivan (**6**) nachgewiesen werden.<sup>137</sup>

Offizielle Dopingkontrollproben die positiv auf Amphetamin oder Methamphetamin getestet wurden und ein Etamivan-Referenzurin wurden benutzt, um die entwickelte Methode zu überprüfen. Die entsprechenden Sulfokonjugate der Stimulanzien konnten klar in allen Proben identifiziert werden (siehe Abbildung 74). Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich sulfokonjugierte Phase-II-Metaboliten als Analyten für die

Bestimmung in einer Direktinjektionsmethode von Urinproben ohne zeit- und kostenintensive Probenvorbereitung eignen.

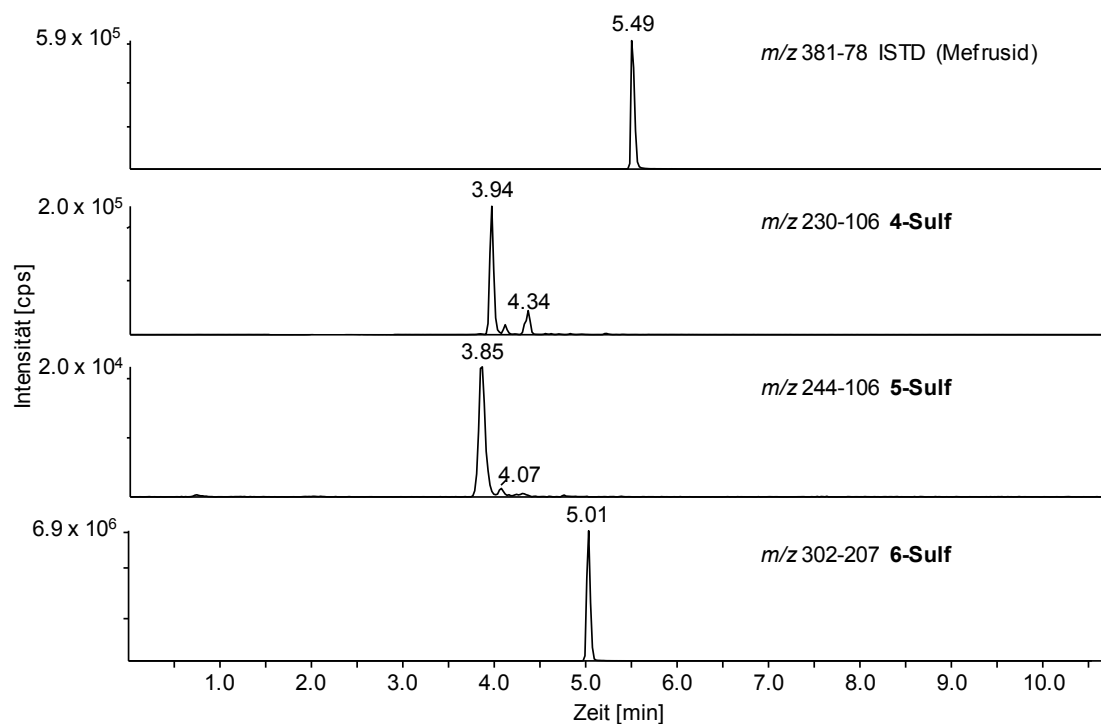


Abbildung 74 Extrahierte Ionenchromatogramme (LC-MS/MS; MRM-Modus) des ISTD Mefrusid und der Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin (**4-Sulf**), *p*-Hydroxymethamphetamin (**5-Sulf**) und Etamivan (**6-Sulf**) in den jeweiligen Ausscheidungsurinen der Stimulanzen

#### 4.4.5 Schlussfolgerung der Screeningprozedur

Sulfokonjugate von Phenolethanolaminen stellen Zielanalyten dar, die unter Umgehung einer komplexen Probenvorbereitung die Möglichkeit zur Vereinfachung von Screeningprozeduren bieten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine geeignete Methode zum Nachweis von Sulfokonjugaten aus Urin nach Aufnahme der jeweiligen Aglyka entwickelt. Dazu konnten synthetisierte phenolisch veresterte Sulfokonjugate als Modellsubstanzen benutzt werden. In der Dopinganalytik werden Stimulanzen bisher in der Regel nach saurer Hydrolyse der Urinproben analysiert.<sup>131</sup> Die Zahl der im Sport verbotenen Substanzen steigt stetig und auch der Anstieg der Probenzahlen zwingt Labore dazu neue Screeningverfahren zu entwickeln. Diese Screeningverfahren kombinieren die Analytik einer Vielzahl an Substanzklassen mit einer vereinfachten

Probenvorbereitung und einen verlässlichen Nachweis. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Analyse von Sulfokonjugaten von Stimulanzien mittels Direktinjektion von Urinproben möglich ist. Dies konnte beispielhaft anhand der Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin, *p*-Hydroxymethamphetamin und Etamivan gezeigt werden. Diese Substanzen wurden zu einem früheren Zeitpunkt synthetisiert und standen somit als Referenzmaterial zur Verfügung.<sup>47</sup> Das Verfahren wurde mit diesem Referenzmaterial erfolgreich validiert. Die Methode basiert auf LC-(ESI)-MS/MS und ermöglicht den gemeinsamen Nachweis der Sulfokonjugate mit Diuretika,  $\beta_2$ -Agonisten, Narkotika, freien Stimulanzien nach direkter Injektion von Urinproben weit unter den geforderten Konzentrationen (MRPL). Die Kombination von verschiedenen Prozeduren reduziert die Kosten, verkürzt die Probendurchlaufzeit und birgt das Potential eine Vielzahl von Substanzen in ein Screeningverfahren einzubeziehen. Zur Überprüfung der Methode wurden Dopingkontrollproben, die positiv für Amphetamin, Methamphetamin waren und ein kontrollierter Etamivan-Referenzurin analysiert. Die jeweiligen Sulfokonjugate konnten eindeutig nachgewiesen werden, so dass der Nachweis der Sulfokonjugate der Stimulanzien eine geeignete Strategie darstellt, um Dopingkontrollproben ohne komplexe Vorbereitung zu analysieren. Die Sulfokonjugate von Octopamin, Etilefrin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol standen zum Zeitpunkt dieser Studie noch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Wenn ausreichend Referenzmaterial zur Verfügung steht, können aber weitere Sulfokonjugate in dieses Verfahren einbezogen werden.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Sulfokonjugate von Phenoethanolaminen auf unterschiedliche Art und Weise synthetisiert. Die so erhaltenen Referenzsubstanzen wurden ausführlich durch LC-(ESI)-MS/MS, HRMS und NMR charakterisiert und wurden verwendet, um in Ausscheidungsstudien der jeweiligen Muttersubstanzen Informationen zur Ausscheidung sulfokonjugierter Metaboliten zu erhalten. Zusätzlich wurde mit Hilfe von bereits vorhandenem Referenzmaterial der Sulfokonjugate von *p*-Hydroxyamphetamin, *p*-Hydroxymethamphetamin und Etamivan eine Methode entwickelt, um diese Substanzen im Dopingkontrollurinproben nachzuweisen. Das Verfahren stellte sich aufgrund seiner guten Präzision, hoher Spezifität, niedriger Nachweisgrenzen und Robustheit als sehr valide heraus.

Stimulanzien und  $\beta_2$ -Sympathomimetika sind aufgrund ihrer leistungssteigernden Eigenschaften von der *World-Anti-Doping-Agency* (WADA) zur Anwendung im Sport verboten. Verschiedene Sympathomimetika ( $\alpha$ - und  $\beta_2$ -Agonisten) werden als Konjugate ausgeschieden und bisher nach chemischer Hydrolyse der Phase-II-Metaboliten bei Dopingkontrollen mittels LC-MS/MS oder GC-MS analysiert. Analytische Verfahren in der Dopinganalytik befinden sich in einer ständigen Entwicklung, um die steigende Anzahl von verbotenen Substanzen und hohe Probenzahlen mittels zeit- und kostensparender Analyseverfahren kompensieren zu können. Eine Möglichkeit bietet die Direktinjektion von Urinproben ohne vorangehende, zeitaufwendige Probenvorbereitung einschließlich Konjugatspaltung. Zum Nachweis von verbotenen Substanzen mittels Direktmessung aus Urin sind detaillierte Kenntnisse zum Metabolismus der jeweiligen Substanzen notwendig, um geeignete Zielanalyten auszuwählen. Dabei sind insbesondere Informationen zum Phase-II-Metabolismus entscheidend, da eine Hydrolyse der Phase-II-Konjugate bei der Direktinjektion von Urinproben entfällt. Zur Entwicklung geeigneter analytischer Methoden und Charakterisierung der intakten Konjugate ist Referenzmaterial erforderlich, das im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich synthetisiert wurde. So konnte ausreichend Referenzsubstanz der Sulfokonjugate von Etilefrin, Octopamin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol erhalten werden, um es mittels LC-(ESI)-MS/MS, HRMS und NMR zu charakterisieren. Zur Gewinnung der

Referenzsubstanzen wurde die unselektive chemische Synthese, die Synthese unter Zuhilfenahme von Schutzgruppen, die *in vitro*-Synthese und das Isolieren der Zielanalyten aus Ausscheidungsurinproben untersucht und miteinander verglichen. Aufgrund der Struktur der Sympathomimetika, die sowohl phenolische als auch alkylische Hydroxygruppen besitzen, führt eine direkte Umsetzung der Edukte mit den Sulfonierungsreagenzien zu verschiedenen, sulfokonjugierten Produkten, wobei in der Regel nur eines davon nach Applikation der entsprechenden Substanz im menschlichen Körper gebildet und mit dem Urin ausgeschieden wird. Schutzgruppenreaktionen, um die Reaktion zu sulfokonjugierten Nebenprodukten zu vermeiden, wiesen sich als nicht vorteilhaft aus, da bereits diese unselektiv reagierten. Zur Synthese wurde eine unselektive Sulfonierung durch Schwefel-Trioxid-Pyridin-Komplex mit angeschlossener komplexer Aufreinigung der Ansätze gewählt. Der Einsatz eines präparativen LC-UV-Systems mit Fraktionssammler hat dabei bei der Aufreinigung der polaren Syntheseansätze im Vergleich zur Säulenchromatografie eine effizientere und beschleunigte Aufreinigung erbracht.

Die *in vitro*-Syntheseversuche erbrachten Erkenntnisse zum Sulfonierungsvermögen von verschiedenen Sulfotransferasen und auch zur Verteilung dieser in verschiedenen humanen Geweben. Sowohl SULT1A1 als auch SULT1A3 sind in der Lage, 4-Hydroxypositionen als auch 3-Hydroxypositionen und / oder 5-Hydroxypositionen von Phenolresten zu sulfokonjugieren. Ein Unterschied ist lediglich im Verhältnis der entstehenden Metaboliten zu beobachten. Im Intestinum wird vor allem durch die SULT1A3 und in der Leber vorwiegend durch die SULT1A1 sulfoniert. Die Sulfonierung in Lunge und Niere findet nur in einem geringen Ausmaß statt.

Mit Hilfe der erhaltenen Referenzmaterialien der Sulfokonjugate von Octopamin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol war es möglich, Ausscheidungsurinproben der jeweiligen Aglyka zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Octopamin, Terbutalin, Fenoterol und Salbutamol überwiegend sulfokonjugiert ausgeschieden werden und eine Exkretion der Sulfokonjugate die an der phenolischen Position verestert sind, typisch ist. Für das  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Fenoterol konnten drei verschiedene Sulfokonjugate *in vitro* synthetisiert und erstmalig auch *in vivo* nachgewiesen werden.

Mit den Sulfokonjugaten der Stimulanzien *p*-Hydroxyamphetamin, *p*-Hydroxymethamphetamin und Etamivan als Modellsubstanzen konnte erfolgreich eine Screeningprozedur mittels LC-MS/MS entwickelt werden, die die Hydrolyse der Konjugate umgeht und gleichzeitig den empfindlichen und spezifischen Nachweis der Zielanalyten ermöglicht. Die hier analysierten Sulfokonjugate demonstrieren den Vorteil einer breiten Anwendbarkeit der Direktinjektion von Urin, die in Zukunft eine Implementierung weiterer Phase-II-Metaboliten ermöglichen soll. Dabei zeichnet sich die Methode durch ein Minimum an Probenvorbereitung aus, womit sie besonders kostengünstig und schnell wird und einen erhöhten Probendurchsatz im Labor ermöglicht. Im Zuge der Vereinfachung von Analysemethoden in der Dopinganalytik mit dem Ziel viele verschiedenen Substanzklassen in einer Prozedur zu erfassen, ermöglicht die entwickelte Direktinjektionsmethode mittels LC-MS/MS eine kombinierte Analytik mit Substanzen, die überwiegend unverändert ausgeschieden werden (z. B. Diuretika, Narkotika, bestimmte Stimulanzien und  $\beta_2$ -Agonisten).





## 6 Literatur

- [1] WADA, **2013**, The 2013 Prohibited List. Verfügbar unter: <http://www.wada-ama.org/en/world-anti-doping-program/sports-and-anti-doping-organizations/international-standards/prohibited-list/>, Zugriff 10.03.2013
- [2] Sardela, V.F.; Deventer, K.; Pereira, H.M.G.; De Aquino Neto, F.R.; Van Eenoo, P. Development and validation of a ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the direct detection of formoterol in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 70, 471-475.
- [3] Badoud, F.; Grata, E.; Perrenoud, L.; Avois, L.; Saugy, M.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry: I. Screening analysis. *Journal of Chromatography A, Including Electrophoresis, Mass Spectrometry and other Separation and Detection Methods*. **2009**, 1216 (20), 4423-4433.
- [4] Thörngren, J.O.; Ostervall, F.; Garle, M. A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, 43 (7), 980-992.
- [5] Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Kortig, M. *Arzneimittelwirkungen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2001**.
- [6] Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R.G.; Windmill, K.F.; Martin, J.L.; Mcmanus, M.E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* **2006**, 90 (1), 5-22.
- [7] Cappiello, M.; Giuliani, L.; Pacifici, G.M. Differential distribution of phenol and catechol sulphotransferases in human liver and intestinal mucosa. *Pharmacology* **1990**, 40 (2), 69-76.
- [8] Bandurski, R.S.; Wilson, L.G.; Squires, C.L. The Mechanism of Active Sulfate Formation. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, 78 (24), 6408-6409.
- [9] Thews, G.; Mutschler, E.; Vaupel, P. *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1999**.
- [10] Dohlman, H.G.; Caron, M.G.; Lefkowitz, R.J. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **1987**, 26 (10), 2657-2664.

- [11] Lefkowitz, R.J.; Sun, J.-P.; Shukla, A.K. A crystal clear view of the [beta]2-adrenergic receptor. *Nature Biotechnology* **2008**, 26 (2), 189-191.
- [12] Stryer, L. *Biochemie*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **1996**.
- [13] Rasmussen, S.G.F.; Choi, H.-J.; Fung, J.J.; Pardon, E.; Casarosa, P.; Chae, P.S.; Devree, B.T.; Rosenbaum, D.M.; Thian, F.S.; Kobilka, T.S.; Schnapp, A.; Konetzki, I.; Sunahara, R.K.; Gellman, S.H.; Pautsch, A.; Steyaert, J.; Weis, W.I.; Kobilka, B.K. Structure of a nanobody-stabilized active state of the [bgr]2 adrenoceptor. *Nature* **2011**, 469 (7329), 175-180.
- [14] Rasmussen, S.G.F.; Devree, B.T.; Zou, Y.; Kruse, A.C.; Chung, K.Y.; Kobilka, T.S.; Thian, F.S.; Chae, P.S.; Pardon, E.; Calinski, D.; Mathiesen, J.M.; Shah, S.T.A.; Lyons, J.A.; Caffrey, M.; Gellman, S.H.; Steyaert, J.; Skiniotis, G.; Weis, W.I.; Sunahara, R.K.; Kobilka, B.K. Crystal structure of the [bgr]2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **2011**, 477 (7366), 549-555.
- [15] Jänig, W. Vegetatives Nervensystem; in *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M., Eds. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2010**; 404-474.
- [16] Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Roth, H.J. *Medizinische Chemie*; Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [17] Van Eenoo, P.; Delbeke, F.T.  $\beta$ -Adrenergic stimulation; in *Handbook of Experimental Pharmacology* Springer-Verlag, Heidelberg, **2010**; 227-249.
- [18] Fachinformation Effortil (R) 5mg Tabletten; Boehringer Ingelheim.
- [19] Donike, M.; Dell, H.D.; Kamp, R. Comparison of etilefrine hydrochloride (non-retarded) and etilefrine hydrochloride in retard pellets in a crossover trial in humans - study of absorption time, absorption rate, blood-levels and biological half-life. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* **1978**, 28-1 (5), 856-860.
- [20] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling, M. *Pharmakologie und Toxikologie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**.
- [21] Hengstmann, J.H.; Weyand, U.; Dengler, H.J. Physiological disposition of etilefrine in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1975**, 9 (2-3), 179-187.
- [22] Hengstmann, J.H.; Konen, W.; Konen, C.; Eichelba.M; Dengler, H.J. Physiological disposition of para-octopamine in man. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **1974**, 283 (1), 93-106.

- [23] Boulton, A.A.; Davis, B.A. The metabolism of ingested deuterium-labeled p-tyramine in normal subjects. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1987**, *14* (5), 207-211.
- [24] Koch, A.; Sigmund, G.; Guddat, S.; Thevis, M.; Schänzer, W. Octopamine and biogenic amines; in *Recent Advances in Doping Analysis (18)*, Schänzer, W.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck, U., Eds. Sport und Buch Strauß, Cologne, **2010**; 163-166.
- [25] Pacifici, G.M.; Eligi, M.; Giuliani, L. (+) And (-) terbutaline are sulfated at a higher rate in human intestine than in liver. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1993**, *45* (5), 483-487.
- [26] Davies, D.S.; George, C.F.; Blackwel, E.; Conolly, M.E.; Dollery, C.T. Metabolism of terbutaline in man and dog. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1974**, *1* (2), 129-136.
- [27] Tegner, K.; Nilsson, H.T.; Persson, C.G.A.; Persson, K.; Ryrfeldt, A. Elimination pathways of terbutaline. *European Journal of Respiratory Diseases* **1984**, *65*, 93-100.
- [28] Nilsson, H.T.; Tegner, K.; Persson, K. Metabolism of terbutaline in man. *Xenobiotica* **1972**, *2* (4), 363-375.
- [29] Hochhaus, G.; Mollmann, H. Pharmacokinetic pharmacodynamic characteristics of the beta-2-agonists terbutaline, salbutamol and fenoterol. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **1992**, *30* (9), 342-362.
- [30] Hornblad, Y.; Ripe, E.; Magnusson, P.O.; Tegner, K. Metabolism and clinical activity of terbutaline and its prodrug ibuterol. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1976**, *10* (1), 9-18.
- [31] Walle, T.; Walle, U.K. Stereoselective sulfate conjugation of racemic terbutaline by human liver cytosol. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1990**, *30* (1), 127-133.
- [32] Borgstrom, L.; Nyberg, L.; Jonsson, S.; Lindberg, C.; Paulson, J. Pharmacokinetic evaluation in man of terbutaline given as separate enantiomers and as the racemate. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1989**, *27* (1), 49-56.
- [33] Nyberg, L.; Rosenborg, J.; Weibull, E.; Jonsson, S.; Kennedy, B.M.; Nilsson, M. Pharmacokinetics of bambuterol in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* **1998**, *45* (5), 471-478.
- [34] Rosenborg, J.; Larsson, P.; Nyberg, L. Pharmacokinetics of bambuterol during oral administration of plain tablets and solution to healthy adults. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2000**, *49* (3), 199-206.

- [35] Tunek, A.; Levin, E.; Svensson, L.A. Hydrolysis of H-3 bambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory-animals *in vitro*. *Biochemical Pharmacology* **1988**, 37 (20), 3867-3876.
- [36] Svensson, L.A.; Tunek, A. The design and bioactivation of presystemically stable prodrugs. *Drug Metabolism Reviews* **1988**, 19 (2), 165-194.
- [37] Buchelt, L.; Rominger, K.L. Pharmacokinetics and metabolism of TH-1165-A in humans. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **1972**, 1 (4 (Suppl)), 37-41.
- [38] Hildebrandt, R.; Wagner, B.; Preissnowzohour, K.; Gundertremy, U. Fenoterol metabolism in man - sulfation versus glucuronidation. *Xenobiotica* **1994**, 24 (1), 71-77.
- [39] Henze, M.K.; Opfermann, G.; Spahn-Langguth, H.; Schänzer, W. Screening of beta-2 agonists and confirmation of fenoterol, orciprenaline, reproterol and terbutaline with gas chromatography-mass spectrometry as tetrahydroisoquinoline derivatives. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **2001**, 751 (1), 93-105.
- [40] Henze, M.K.; Opfermann, G.; Spahn-Langguth, H.; Schänzer, W. Screening of Beta-2-Agonists and Confirmation of Fenoterol, Reproterol, Orciprenaline and Terbutaline after Cyclisation with Formaldehyde; in *Recent Advances in Doping Analysis* (8), Schänzer, W.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck-Engelke, U., Eds. Sport und Buch Strauß, Köln, **2000**; 59-67.
- [41] Laros, C.D.; Vanurk, P.; Rominger, K.L. Absorption, distribution and excretion of tritium-labeled beta-2-stimulator fenoterol hydrobromide following aerosol administration and instillation into bronchial tree. *Respiration* **1977**, 34 (3), 131-140.
- [42] Rominger, K.L.; Pollmann, W. Comparative pharmacokinetic studies on fenoterolhydrobromide in rat, dog and man. *Arzneimittel-Forschung* **1972**, 22 (7), 1190-1196.
- [43] Koster, A.S.; Hofman, G.A.; Frankhuijzen-Sierevogel, A.C.; Noordhoek, J. Presystemic and systemic intestinal metabolism of fenoterol in the conscious rat. *Drug Metabolism and Disposition* **1985**, 13 (4), 464-470.
- [44] Wilson, A.A.; Wang, J.; Koch, P.; Walle, T. Stereoselective sulphate conjugation of fenoterol by human phenolsulphotransferases. *Xenobiotica* **1997**, 27 (11), 1147-1154.
- [45] Ahrens, R.C.; Smith, G.D. Albuterol - an adrenergic agent for use in the treatment of asthma pharmacology, pharmacokinetics and clinical use. *Pharmacotherapy* **1984**, 4 (3), 105-121.

- [46] Mareck, U.; Guddat, S.; Schwenke, A.; Beuck, S.; Geyer, H.; Flenker, U.; Elers, J.; Backer, V.; Thevis, M.; Schänzer, W. Determination of salbutamol and salbutamol glucuronide in human urine by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* **2011**, 3 (11-12), 820-827.
- [47] Parr, M.K.; Orlovius, A.K.; Guddat, S.; Gütschow, M.; Thevis, M.; Schänzer, W. Sulfoconjugates of heavy volatile nitrogen containing doping substances for improved LC-MS/MS screening; in *Recent Advances in Doping Analysis (15)*, Schänzer, W.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck, U., Eds. Sport und Buch Strauß, Köln, **2007**; 97-102.
- [48] Lin, C.; Li, Y.; Mcglotten, J.; Morton, J.B.; Symchowicz, S. Isolation and identification of major metabolite of albuterol in human urine. *Drug Metabolism and Disposition* **1977**, 5 (3), 234-238.
- [49] Joyce, K.B.; Jones, A.E.; Scott, R.J.; Biddlecombe, R.A.; Pleasance, S. Determination of the enantiomers of salbutamol and its 4-O-sulphate metabolites in biological matrices by chiral liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, 12 (23), 1899-1910.
- [50] Evans, M.E.; Walker, S.R.; Brittain, R.T.; Paterson, J.W. Metabolism of salbutamol in man. *Xenobiotica* **1973**, 3 (2), 113-120.
- [51] Nagata, K.; Yamazoe, Y. Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2000**, 40, 159-76.
- [52] Mulder, G.J.; Jakoby, W.B. Sulfation; in *Conjugation Reactions in Drug Metabolism*, Mulder, G. J., Ed. Taylor and Francis Ltd, London, **1990**; 107-161.
- [53] Lipmann, F. Biological sulfate activation and transfer. *Science (New York, N.Y.)* **1958**, 128 (3324), 575-580.
- [54] Mulder, G.J. *Sulfatation of Drugs and Related Compounds*; CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, **1981**.
- [55] Venkatachalam, K.V. Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: biochemistry, molecular biology and genetic deficiency. *IUBMB Life* **2003**, 55 (1), 1-11.
- [56] Gamage, N.U.; Duggleby, R.G.; Barnett, A.C.; Tresillian, M.; Latham, C.F.; Liyou, N.E.; Mcmanus, M.E.; Martin, J.L. Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (9), 7655-7662.

- [57] Weinshilboum, R.M.; Otterness, D.M.; Aksoy, I.A.; Wood, T.C.; Her, C.; Raftogianis, R.B. Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *The FASEB Journal* **1997**, *11* (1), 3-14.
- [58] Reiter, C.; Mwaluko, G.; Dunnette, J.; Van Loon, J.; Weinshilboum, R. Thermolabile and thermostable human platelet phenol sulfotransferase. Substrate specificity and physical separation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **1983**, *324* (2), 140-147.
- [59] Coughtrie, M.W.H.; David S. Goldstein, G.E.; Richard, M. Catecholamine sulfation in health and disease; in *Advances in Pharmacology* Academic Press, **1997**; 339-342.
- [60] Dooley, T.P.; Haldeman-Cahill, R.; Joiner, J.; Wilborn, T.W. Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *277* (1), 236-245.
- [61] Cook, I.; Wang, T.; Almo, S.C.; Kim, J.; Falany, C.N.; Leyh, T.S. The Gate That Governs Sulfotransferase Selectivity. *Biochemistry* **2013**, *52* (2), 415-424.
- [62] Kakuta, Y.; Pedersen, L.G.; Carter, C.W.; Negishi, M.; Pedersen, L.C. Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nature Structural Biology* **1997**, *4* (11), 904-908.
- [63] Brix, L.A.; Duggleby, R.G.; Gaedigk, A.; Mcmanus, M.E. Structural characterization of human aryl sulphotransferases. *The Biochemical Journal* **1999**, *337* ( Pt 2), 337-343.
- [64] Brix, L.A.; Barnett, A.C.; Duggleby, R.G.; Leggett, B.; Mcmanus, M.E. Analysis of the substrate specificity of human sulfotransferases SULT1A1 and SULT1A3: site-directed mutagenesis and kinetic studies. *Biochemistry* **1999**, *38* (32), 10474-10479.
- [65] Duffel, M.W.; Jakoby, W.B. On the mechanism of aryl sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256* (21), 11123-11127.
- [66] Whittemore, R.M.; Pearce, L.B.; Roth, J.A. Purification and kinetic characterization of a phenol-sulfating form of phenol sulfotransferase from human brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1986**, *249* (2), 464-471.
- [67] Lewis, A.J.; Kelly, M.M.; Walle, U.K.; Eaton, E.A.; Falany, C.N.; Walle, T. Improved bacterial expression of the human P form phenolsulfotransferase. Applications to drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* **1996**, *24* (11), 1180-1185.

- [68] Barnett, A.C.; Tsvetanov, S.; Gamage, N.; Martin, J.L.; Duggleby, R.G.; Mcmanus, M.E. Active site mutations and substrate inhibition in human sulfotransferase 1A1 and 1A3. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279 (18), 18799-18805.
- [69] Gamage, N.U.; Tsvetanov, S.; Duggleby, R.G.; Mcmanus, M.E.; Martin, J.L. The Structure of Human SULT1A1 Crystallized with Estradiol: An insight into active site plasticity and substrate inhibition with multi-ring substrates. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (50), 41482-41486.
- [70] Hegedüs, B. Synthesen von Schwefelsäureestern des Dopamins und verwandten Verbindungen. *Helvetica Chimica Acta* **1963**, 46 (7), 2604-2612.
- [71] Gilbert, E.E. The reactions of sulfur trioxide, and of its adducts, with organic compounds. *Chemical Reviews* **1962**, 62 (6), 549-589.
- [72] Burkhardt, G.N.; Lapworth, A. Arylsulphuric Acids. *Journal of the Chemical Society* **1926**, 684.
- [73] Kaspersen, F.M.; Vanboeckel, C.A.A. A review of the methods of chemical synthesis of sulfate and glucuronide conjugates. *Xenobiotica* **1987**, 17 (12), 1451-1471.
- [74] Lernhardt, U.; Strobel, G.; Schell, H.; Werle, E.; Weicker, H. Modified syntheses of dopamine-4-sulfate, epinephrine-3-sulfate, and norepinephrine-3-sulfate - determination of the position of the sulfate group by H-1-NMR spectroscopy. *International Journal of Sports Medicine* **1988**, 9, 89-92.
- [75] Dusza, J.P.; Joseph, J.P.; Bernstein, S. Steroid conjugates .4. Preparation of steroid sulfates with triethylamine-sulfur trioxide. *Steroids* **1968**, 12 (1), 49-61.
- [76] Harbeson, S.L.; Kerkman, D.J.; Debernardis, J.F. A facile synthesis of dopamine-4-sulfate. *Organic Preparations and Procedures International* **1983**, 15 (4), 243-249.
- [77] Wrighton, S.A.; Vandenbranden, M.; Stevens, J.C.; Shipley, L.A.; Ring, B.J.; Rettie, A.E.; Cashman, J.R. In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metabolism Reviews* **1993**, 25 (4), 453-484.
- [78] Wong, C.C.; Meinel, W.; Glatt, H.R.; Barron, D.; Stalmach, A.; Steiling, H.; Crozier, A.; Williamson, G. In vitro and in vivo conjugation of dietary hydroxycinnamic acids by UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2010**, 21 (11), 1060-1068.

- [79] Kuuranne, T.; Leinonen, A.; Schänzer, W.; Kamber, M.; Kostianen, R.; Thevis, M. Aryl-propionamide-derived selective androgen receptor modulators: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of the in vitro synthesized metabolites for doping control purposes. *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, 36 (3), 571-581.
- [80] Falany, C.N.; Falany, J.L.; Wang, J.; Hedstrom, J.; Chelpin, H.V.; Swedmark, S. Studies on sulfation of synthesized metabolites from the local anesthetics ropivacaine and lidocaine using human cloned sulfotransferases. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, 27 (9), 1057-1063.
- [81] Budzikiewicz, H.; Schäfer, M. *Massenspektrometrie*; Wiley-VCH G,bH & Co KGaA, Weinheim, **2012**.
- [82] Levsen, K.; Schiebel, H.M.; Behnke, B.; Dotzer, R.; Dreher, W.; Elend, M.; Thiele, H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of Chromatography A, Including Electrophoresis, Mass Spectrometry and other Separation and Detection Methods* **2005**, 1067 (1-2), 55-72.
- [83] Lottspeich, F.; Zorbas, H. *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, **1998**.
- [84] De Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, Ltd, Cichester, **2007**.
- [85] *Exactive Plus and Q Exactive Operations - Training Course Manual*. **2013**, Unity Lab Services Training Courses.
- [86] Davis, E.; Loiacono, R.; Summers, R.J. The rush to adrenaline: drugs in sport acting on the  $\beta$ -adrenergic system. *British Journal of Pharmacology* **2008**, 154 (3), 584-597.
- [87] WADA, **2012**, 2012 Anti-Doping Testing Figures Report. Verfügbar unter: <http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Testing-Figures/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf>, Zugriff 19.08.2013
- [88] Hemmersbach, P.; De La Torre, R. Stimulants, narcotics and beta-blockers: 25 years of development in analytical techniques for doping control. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **1996**, 687 (1), 221-238.
- [89] Trout, G.J.; Kazlauskas, R. Sports drug testing--an analyst's perspective. *Chemical Society Reviews* **2004**, 33 (1), 1-13.



- [90] Ventura, R.; Damasceno, L.C.; Farré, M.; Cardoso, J.; Segura, J. Analytical methodology for the detection of beta2-agonists in urine by gas chromatography/ mass spectrometry for application in doping control. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 418 (1), 79-92.
- [91] Thevis, M.; Opfermann, G.; Schänzer, W. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for beta(2)-agonists in human or equine urine. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 38 (11), 1197-1206.
- [92] Damasceno, L.; Ventura, R.; Cardoso, J.; Segura, J. Diagnostic evidence for the presence of beta-agonists using two consecutive derivatization procedures and gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, 780 (1), 61-71.
- [93] Van Thuyne, W.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F.T. Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatisation. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, 857 (2), 259-265.
- [94] Van Thuyne, W.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F.T. Implementation of gas chromatography combined with simultaneously selected ion monitoring and full scan mass spectrometry in doping analysis. *Journal of Chromatography A, Including Electrophoresis, Mass Spectrometry and other Separation and Detection Methods* **2008**, 1210 (2), 193-202.
- [95] Thevis, M.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Schänzer, W. Stimulants and doping in sport. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **2010**, 39 (1), 89-105.
- [96] Damasceno, L.; Ventura, R.; Ortuno, J.; Segura, J. Derivatization procedures for the detection of beta(2)-agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35 (11), 1285-1294.
- [97] Brunelli, C.; Bicchi, C.; Di Stilo, A.; Salomone, A.; Vincenti, M. High-speed gas chromatography in doping control: Fast-GC and fast-GC/MS determination of beta-adrenoceptor ligands and diuretics. *Journal of Separation Science* **2006**, 29 (18), 2765-2771.
- [98] Thevis, M.; Schänzer, W. Examples of doping control analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: ephedrine, beta-receptor blocking agents, diuretics, sympathomimetics, and cross-linked hemoglobins. *Journal of Chromatographic Science* **2005**, 43 (1), 22-31.
- [99] Deventer, K.; Pozo, O.J.; Delbeke, F.T.; Van Eenoo, P. Quantitative detection of inhaled formoterol in human urine and relevance to doping control analysis. *Drug Testing and Analysis* **2012**, 4 (6), 449-454.

- [100] Deventer, K.; Pozo, O.J.; Delbeke, F.T.; Van Eenoo, P. Quantitative detection of inhaled salmeterol in human urine and relevance to doping control analysis. *Therapeutic Drug Monitoring* **2011**, 33 (5), 627-631.
- [101] Lu, C.P.; Ren, C.T.; Wu, S.H.; Chu, C.Y.; Lo, L.C. Development of an activity-based probe for steroid sulfatases. *Chembiochem* **2007**, 8 (18), 2187-2190.
- [102] Yuan, S.S.; Bodor, N. Synthesis and activity of (R)-(-)-M-trimethylacetoxymethyl-(methylamino)methyl benzyl alcohol hydrochloride - prodrug form of (R)-(-)-phenylephrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1976**, 65 (6), 929-931.
- [103] Dusza, J.P.; Naunet, N.Y.; Joseph, J.P.; Cliffside Park, N.J.; Bernstein, S., Östrogene, wasserlösliche Konjugate und ihre Herstellung. Bundesrepublik Deutschland (1970) Patentschrift (1945619).
- [104] Graves, C.R.; Zeng, B.S.; Nguyen, S.T. Efficient and selective Al-catalyzed alcohol oxidation via Oppenauer chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (39), 12596-12597.
- [105] Coffey, D.S.; Hawk, M.K.N.; Pedersen, S.W.; Ghera, S.J.; Marler, P.G.; Dodson, P.N.; Lytle, M.L. Large scale deprotection of a tert-butoxycarbonyl (Boc) group using aqueous HCl and acetone. *Organic Process Research & Development* **2004**, 8 (6), 945-947.
- [106] Li, B.; Bemish, R.; Buzon, R.A.; Chiu, C.K.F.; Colgan, S.T.; Kissel, W.; Le, T.; Leeman, K.R.; Newell, L.; Roth, J. Aqueous phosphoric acid as a mild reagent for deprotection of the t-butoxycarbonyl group. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44 (44), 8113-8115.
- [107] El Kazzouli, S.; Koubachi, J.; Berteina-Raboin, S.; Mouaddib, A.; Guillaumet, G. A mild and selective method for the N-Boc deprotection by sodium carbonate. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47 (48), 8575-8577.
- [108] Kuuranne, T.; Kurkela, M.; Thevis, M.; Schänzer, W.; Finel, M.; Kostinen, R. Glucuronidation of anabolic androgenic steroids by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition* **2003**, 31 (9), 1117-1124.
- [109] Roy, A.B. The chemistry of sulfate esters and related compounds; in *Sulfatation of Drugs and Related Compounds*, Mulder, G. J., Ed. CRC Press, Boca Raton, USA, **1981**; 5-30.
- [110] Shima, N.; Tsutsumi, H.; Kamata, T.; Nishikawa, M.; Katagi, M.; Miki, A.; Tsuchihashi, H. Direct determination of glucuronide and sulfate of p-hydroxymethamphetamine in methamphetamine users' urine. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2006**, 830 (1), 64-70.

- [111] Elers, J.; Pedersen, L.; Henninge, J.; Lund, T.K.; Hemmersbach, P.; Dalhoff, K.; Backer, V. Blood and urinary concentrations of salbutamol in asthmatic subjects. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **2010**, *42* (2), 244-249.
- [112] Thieme, D.; Grosse, J.; Lang, R.; Mueller, R.K.; Wahl, A. Screening, confirmation and quantification of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *757* (1), 49-57.
- [113] WADA, **2010**, Minimum required performance levels for detection of prohibited substances - WADA Technical Document - TD2010MRPL. Verfügbar unter: [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA\\_TD2010MRPLv1.0\\_Minimum%20Required%20Performance%20Levels\\_Sept%2001%202010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010MRPLv1.0_Minimum%20Required%20Performance%20Levels_Sept%2001%202010_EN.pdf), Zugriff 09.10.2011
- [114] ICH Harmonised Tripartite Guideline, **1995**, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1): verfügbar unter: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf), Zugriff 09.10.2011
- [115] WADA, **2009**, World Anti-Doping Code, International Standard for Laboratories version 6.0. Verfügbar unter: [www.wada-ama.org](http://www.wada-ama.org), Zugriff 15.07.2011
- [116] Annesley, T.M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **2003**, *49* (7), 1041–1044.
- [117] McLafferty, F.W.; Turecek, F. *Interpretation von Massenspektren*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1993**.
- [118] Budzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams, D.H. *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*; Holden-Day, Inc., San Francisco, **1965**.
- [119] Neelakantan, L. Asymmetric synthesis .2. Synthesis and absolute configuration of oxazolidines derived from (-)-ephedrine and aromatic aldehydes. *Journal of Organic Chemistry* **1971**, *36* (16), 2256-2260.
- [120] Bergmann, E.D. The oxazolidines. *Chemical Reviews* **1953**, *53* (2), 309-352.
- [121] Bergmann, E.D.; Lavie, D.; Pinchas, S. The cleavage of oxazolidines by lithium aluminum hydride. *Journal of the American Chemical Society* **1951**, *73* (12), 5662-5664.
- [122] Sélambarom, J.; Monge, S.; Carré, F.; Roque, J.P.; Pavia, A.A. Stereoelectronic control of oxazolidine ring-opening: structural and chemical evidences. *Tetrahedron* **2002**, *58* (47), 9559-9566.

- [123] Hengartner, U.; Batcho, A.D.; Blount, J.F.; Leimgruber, W.; Larscheid, M.E.; Scott, J.W. New syntheses of racemic tryptophans. *Journal of Organic Chemistry* **1979**, 44 (22), 3748-3752.
- [124] Sheehan, J.C.; Yang, D.D.H. The use of N-formylamino acids in peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, 80 (5), 1154-1158.
- [125] Losse, G.; Zonnchen, W. Die Formylgruppe, eine oxydativ entfernbare Schutzgruppe für Peptidsynthesen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1960**, 636 (1-3), 140-143.
- [126] Riches, Z.; Stanley, E.L.; Bloomer, J.C.; Coughtrie, M.W.H. Quantitative Evaluation of the Expression and Activity of Five Major Sulfotransferases (SULTs) in Human Tissues: The SULT "Pie". *Drug Metabolism and Disposition* **2009**, 37 (11), 2255-2261.
- [127] Raftogianis, R.B.; Wood, T.C.; Weinshilboum, R.M. Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: Genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations. *Biochemical Pharmacology* **1999**, 58 (4), 605-616.
- [128] Thevis, M.; Opfermann, G.; Schänzer, W. N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid promoted synthesis and mass spectrometric characterization of deuterated ephedrine. *European Journal of Mass Spectrometry* **2004**, 10 (5), 673-681.
- [129] Pacifici, G.M.; Giulianetti, B.; Quilici, M.C.; Spisni, R.; Nervi, M.; Giuliani, L.; Gomeni, R. (-)-salbutamol sulphation in the human liver and duodenal mucosa: Interindividual variability. *Xenobiotica* **1997**, 27 (3), 279-286.
- [130] Ko, K.; Kurogi, K.; Davidson, G.; Liu, M.-Y.; Sakakibara, Y.; Suiko, M.; Liu, M.-C. Sulfation of Ractopamine and Salbutamol by the Human Cytosolic Sulfotransferases. *Journal of Biochemistry* **2012**, 152 (3), 275-283.
- [131] Thevis, M. *Mass Spectrometry in Sports Drug Testing - Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, **2010**.
- [132] WADA, **2013**, Minimum required performance levels for detection of prohibited substances - WADA Technical Document - TD2013MRPL. Verfügbar unter: [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical\\_Documents/WADA-TD2013MRPL-Minimum-Required-Performance-Levels-v1-2012-EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2013MRPL-Minimum-Required-Performance-Levels-v1-2012-EN.pdf), Zugriff 20.06.2013
- [133] Dring, L.G.; Smith, R.L.; Williams, R.T. Metabolic fate of amphetamine in man and other species. *Biochemical Journal* **1970**, 116 (3), 425-435.

- [134] Shima, N.; Tsutsumi, H.; Kamata, T.; Nishikawa, M.; Katagi, M.; Miki, A.; Tsuchihashi, H. Direct determination of glucuronide and sulfate of *p*-hydroxymethamphetamine in methamphetamine users' urine. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2006**, *830*, 64-70.
- [135] Caldwell, J.; Dring, L.; Williams, R. Metabolism of [<sup>14</sup>C]methamphetamine in man, the guinea pig and the rat. *Biochemical Journal* **1972**, *129* (1), 11-22.
- [136] Sever, P.S.; Dring, L.G.; Williams, R.T. Urinary metabolites of *p*-hydroxyamphetamine in man, rat and guinea-pig. *Xenobiotica* **1976**, *6* (6), 345-353.
- [137] Kolmonen, M.; Leinonen, A.; Kuuranne, T.; Pelander, A.; Ojanperä, I. Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis. *Drug Testing and Analysis* **2009**, *1*, 250–266.
- [138] Guddat, S.; Solymos, E.; Orlovius, A.; Thomas, A.; Sigmund, G.; Geyer, H.; Thevis, M.; Schänzer, W. High-throughput screening for various classes of doping agents using a new 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-tandem mass spectrometry multi-target approach. *Drug Testing and Analysis* **2011**, *3* (11-12), 836-850.



## 7 Anhang

### 7.1 Sulfokonjugatbildung unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

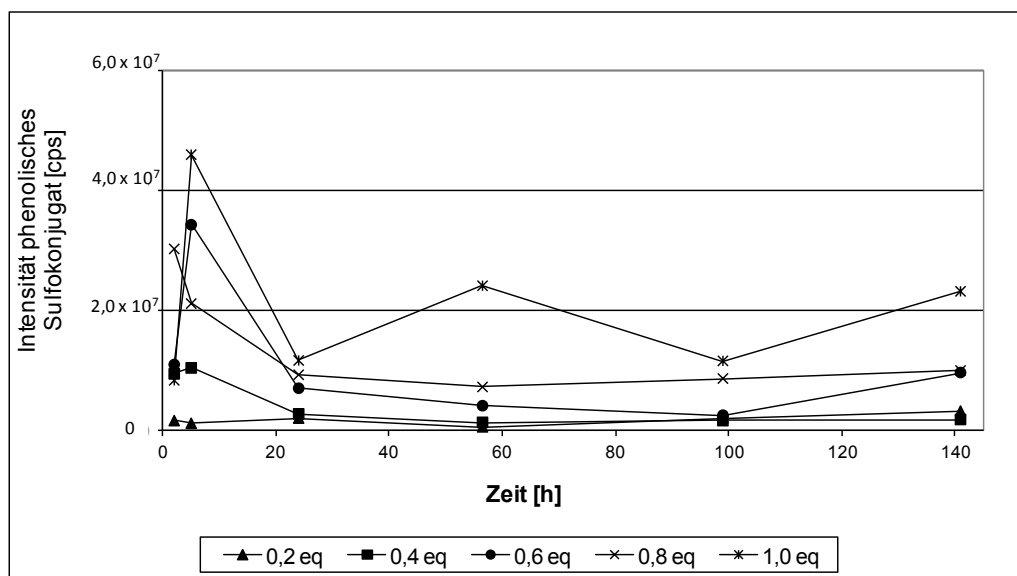


Abbildung 75 Einfluss des molaren Verhältnisses der Edukte (Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex : Etilefrin) auf die Bildung von phenolisch sulfokonjugiertem Etilefrin (**1-Sulf1**) bei 25°C und 20 mg/mL Etilefrin in Pyridin

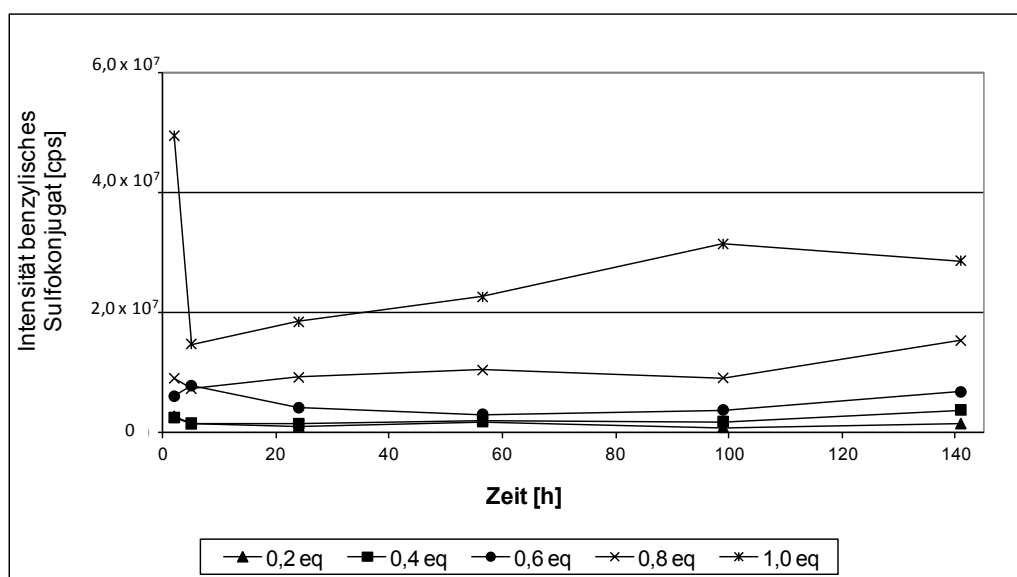


Abbildung 76 Einfluss des molaren Verhältnisses der Edukte (Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex : Etilefrin) auf die Bildung von benzylisch sulfokonjugiertem Etilefrin (**1-Sulf2**) bei 25°C und 20 mg/mL Etilefrin in Pyridin

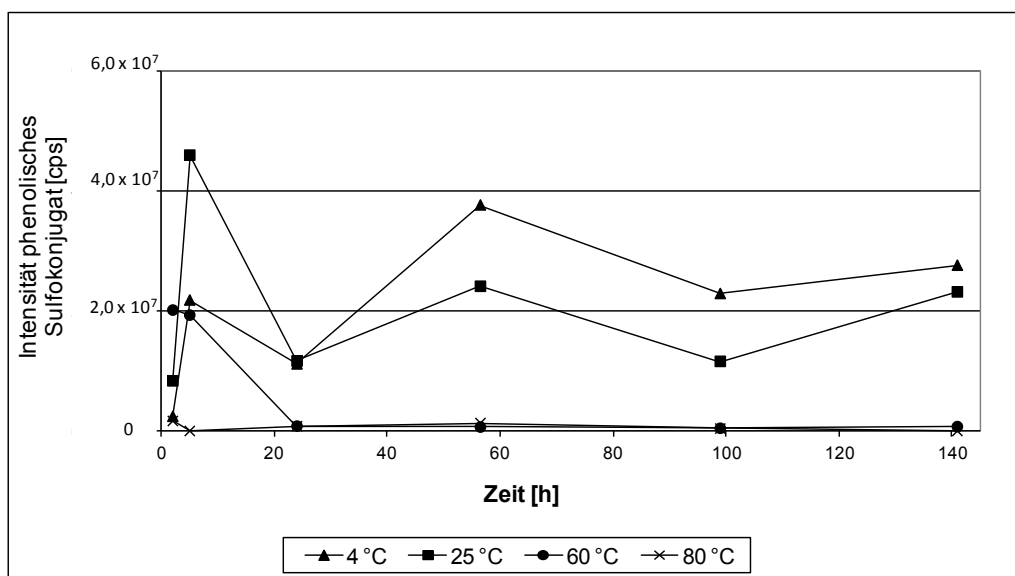


Abbildung 77 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von phenolisch sulfokongugiertem Etilefrin (**1-Sulf1**) bei einem Verhältnis der Edukte von 1 : 1 und 20 mg/mL Etilefrin in Pyridin

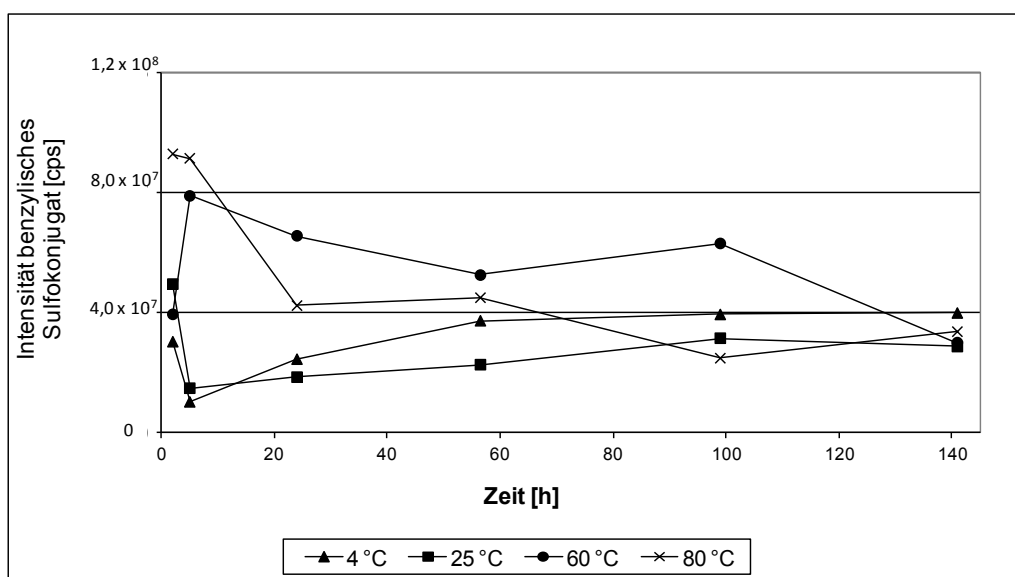


Abbildung 78 Einfluss der Temperatur auf die Bildung von benzylich sulfokongugiertem Etilefrin (**1-Sulf2**) bei einem Verhältnis der Edukte von 1 : 1 und 20 mg/mL Etilefrin in Pyridin



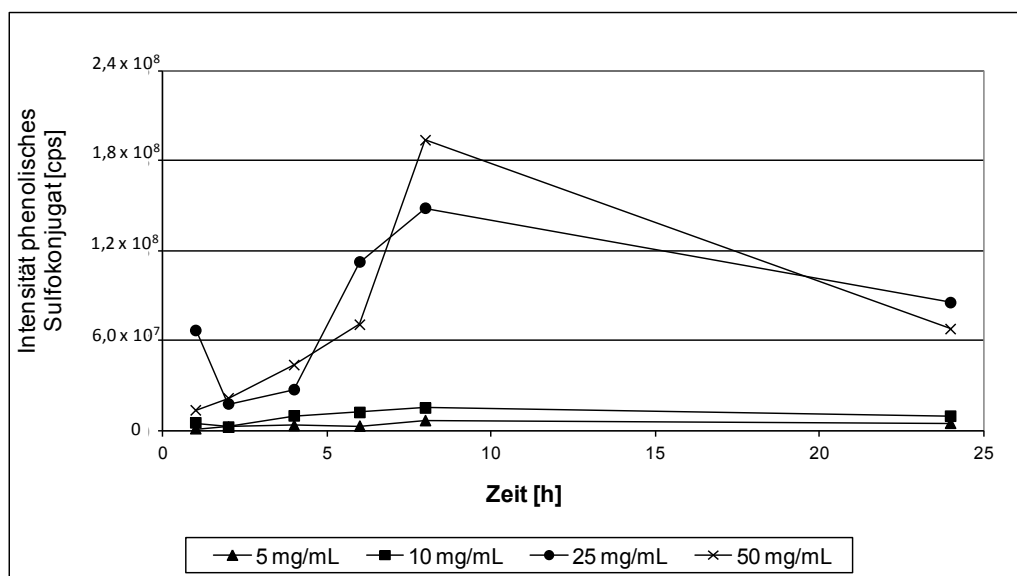


Abbildung 79 Einfluss der Konzentration von Etilefrin auf die Bildung von phenolisch sulfokongugiertem Etilefrin (**1-Sulf1**) bei einem Verhältnis der Edukte von 1 : 1 bei 25°C

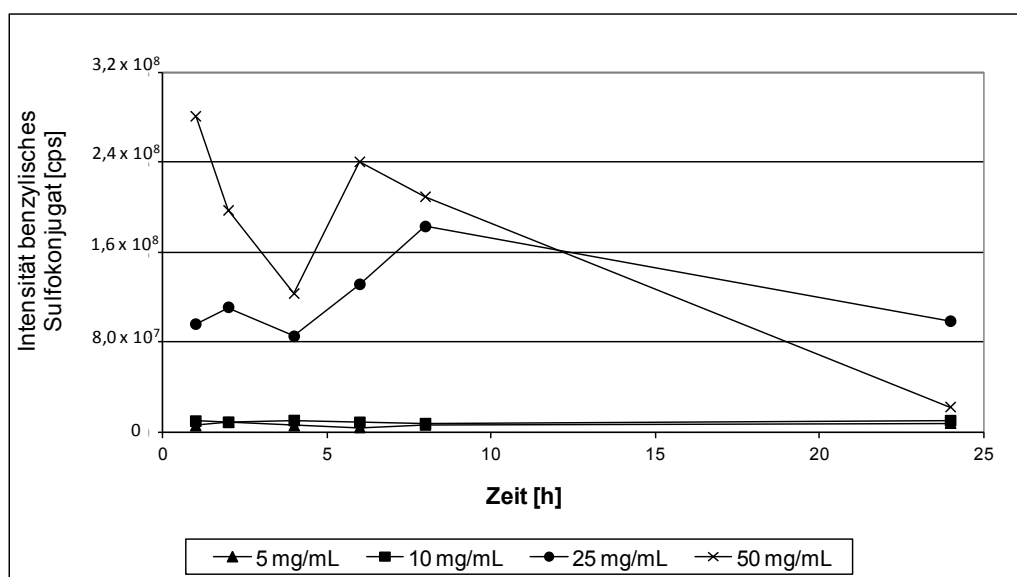


Abbildung 80 Einfluss der Konzentration von Etilefrin auf die Bildung von benzylich sulfokongugiertem Etilefrin (**1-Sulf2**) bei einem Verhältnis der Edukte von 1 : 1 bei 25°C

## 7.2 Massenspektren

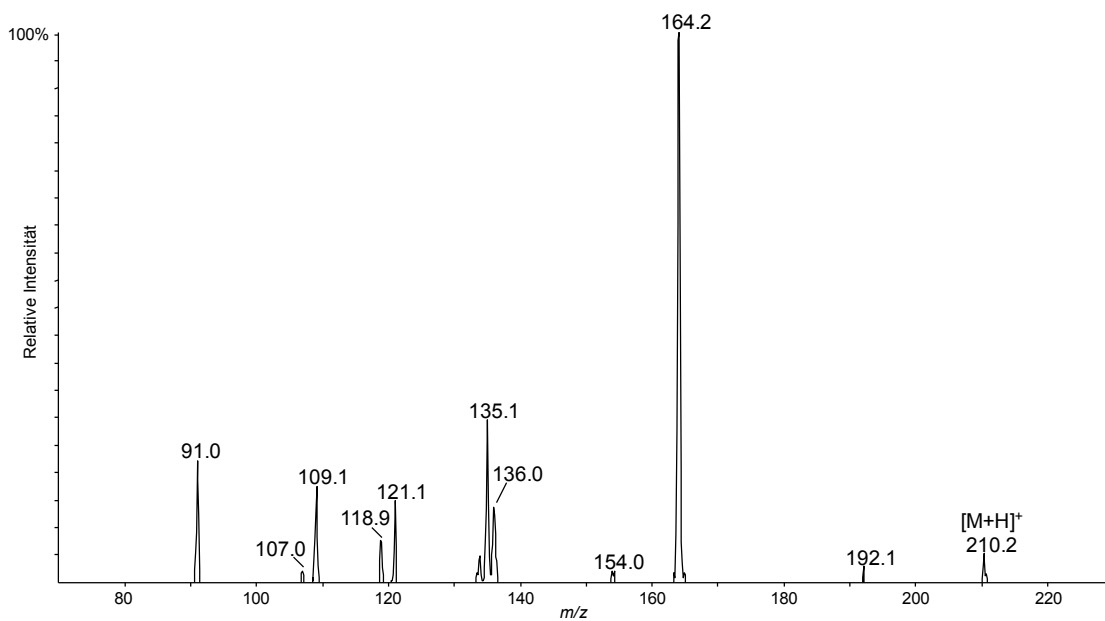


Abbildung 81 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*mono*-Formiat (**14**, RT 5,73 min; CE 30 eV)

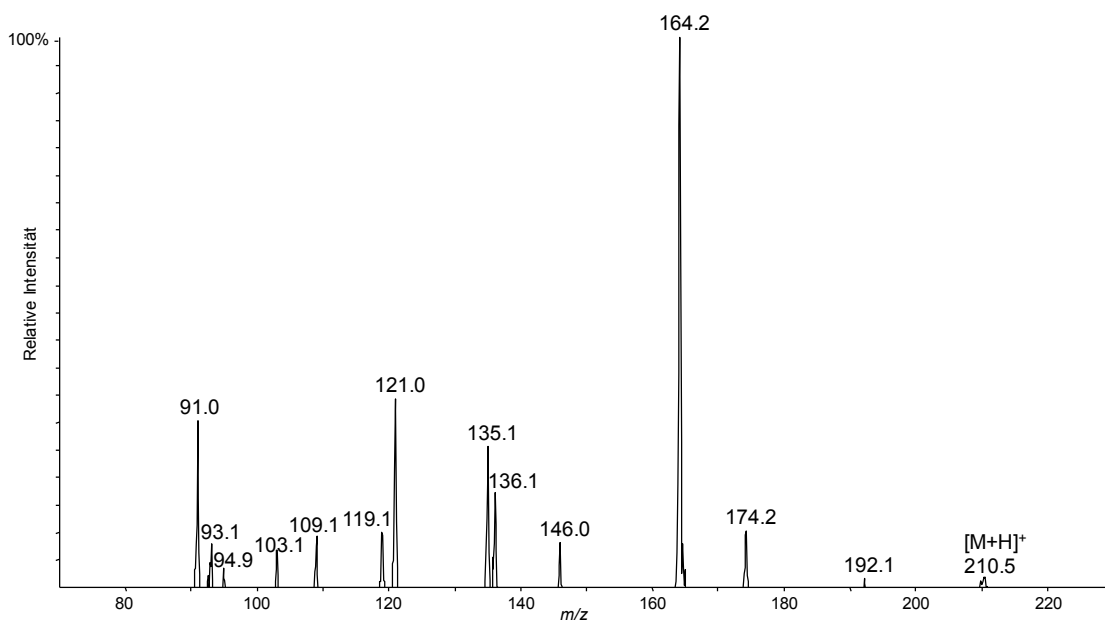


Abbildung 82 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*mono*-Formiat (**15**, RT 7,27 min; CE 30 eV)

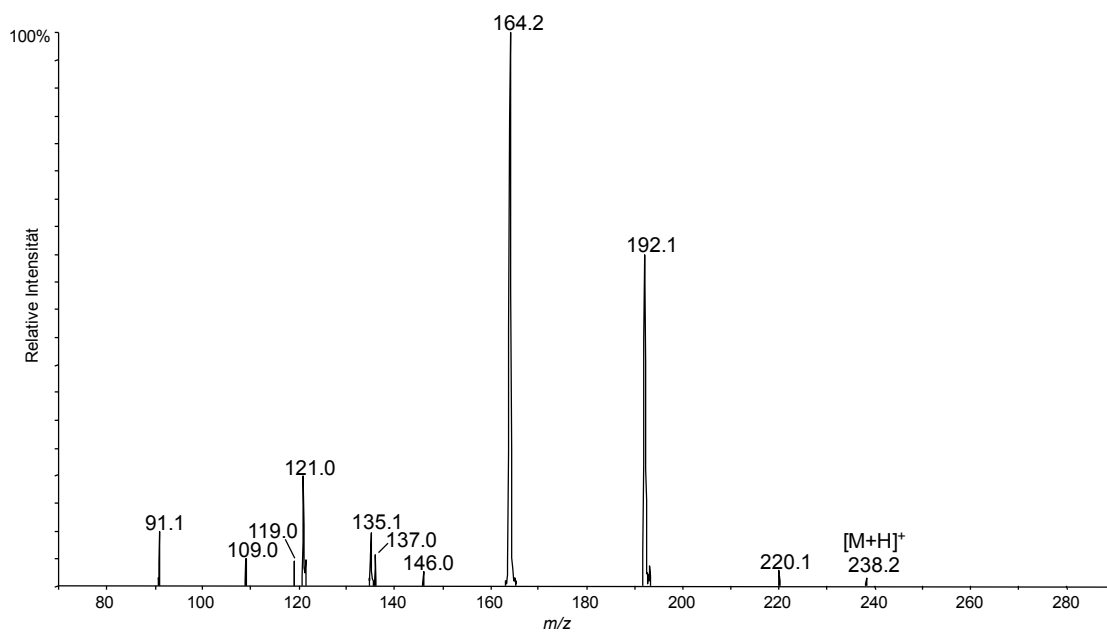


Abbildung 83 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*bis*-Formiat (**16**, RT 7,73 min; CE 30 eV)

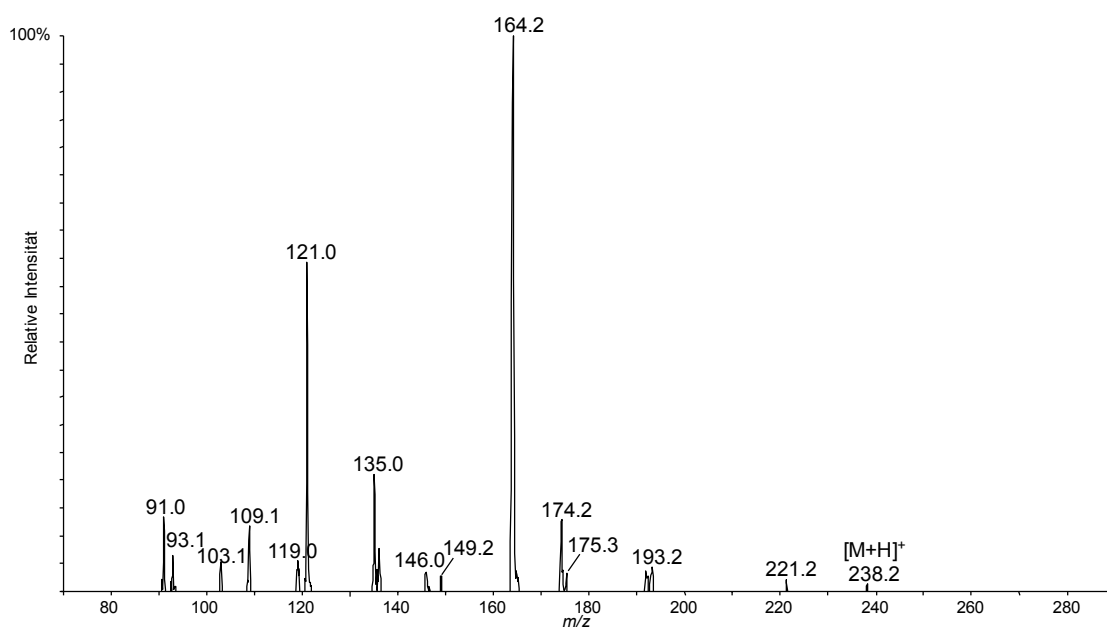


Abbildung 84 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von Etilefrin-*bis*-Formiat (**17**, RT 7,94 min; CE 30 eV)

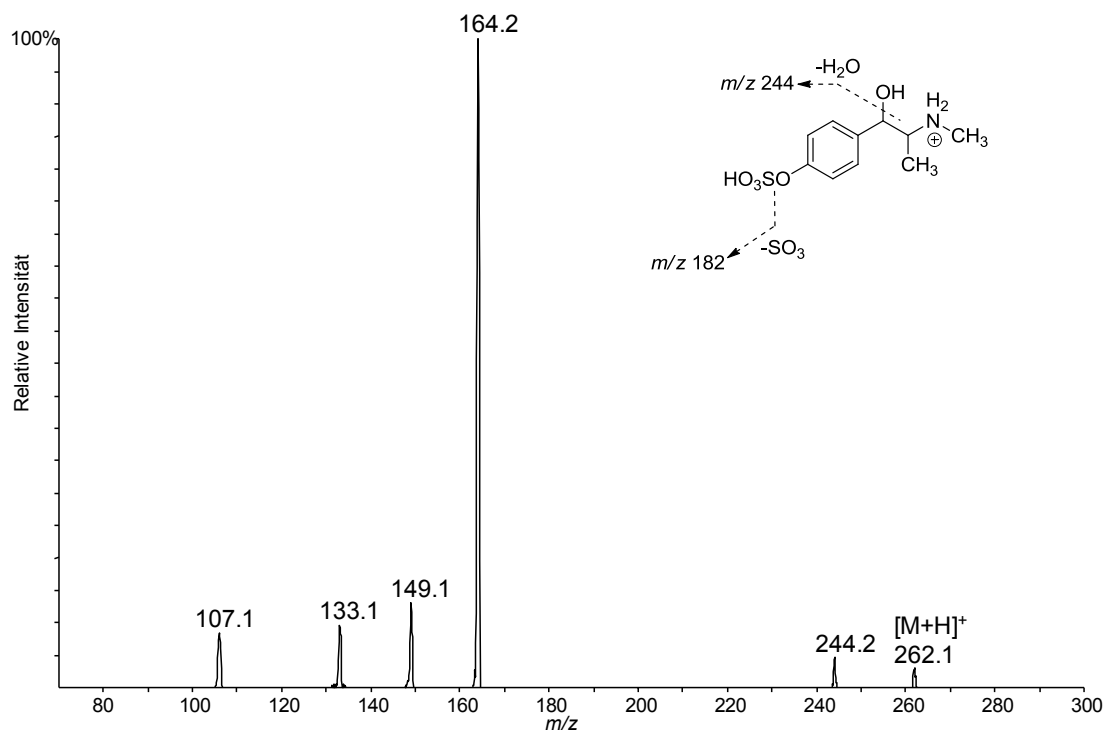


Abbildung 85 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküls  $[M+H]^+$  von *p*-Hydroxyephedrin-Sulfokonjugat (RT 4,72 min, CE 30 eV)

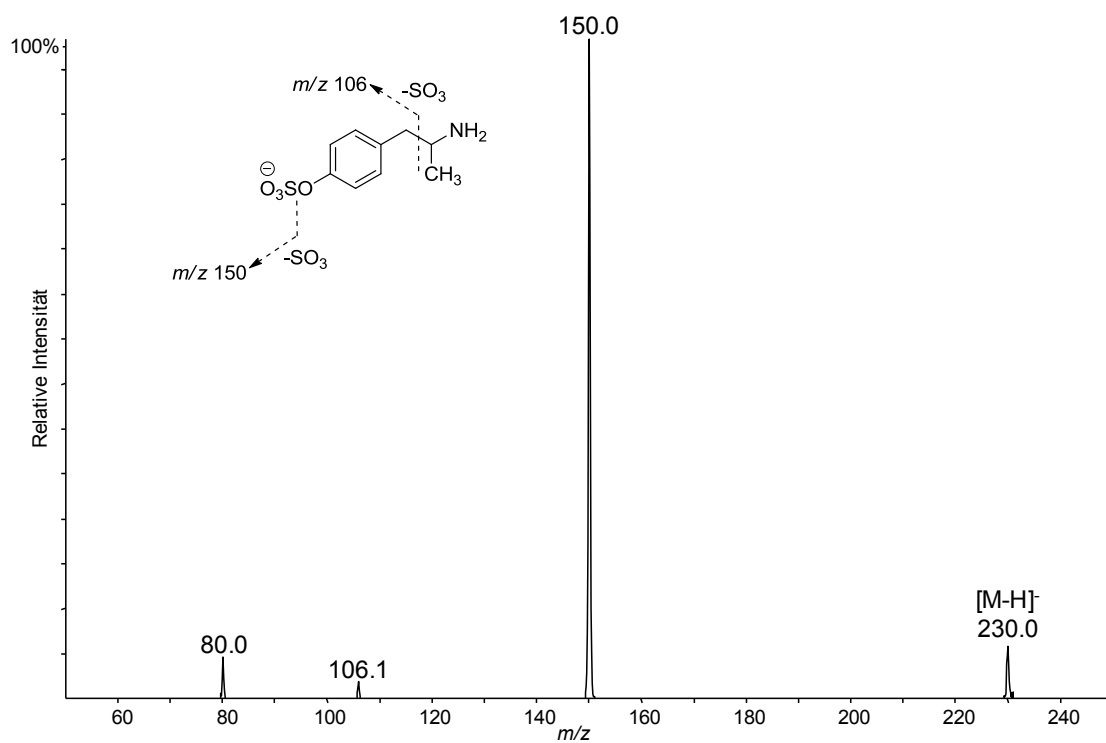


Abbildung 86 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküls  $[M-H]^-$  von *p*-Hydroxyamphetamin-Sulfokonjugat (**4-Sulf**, CE -30 eV)

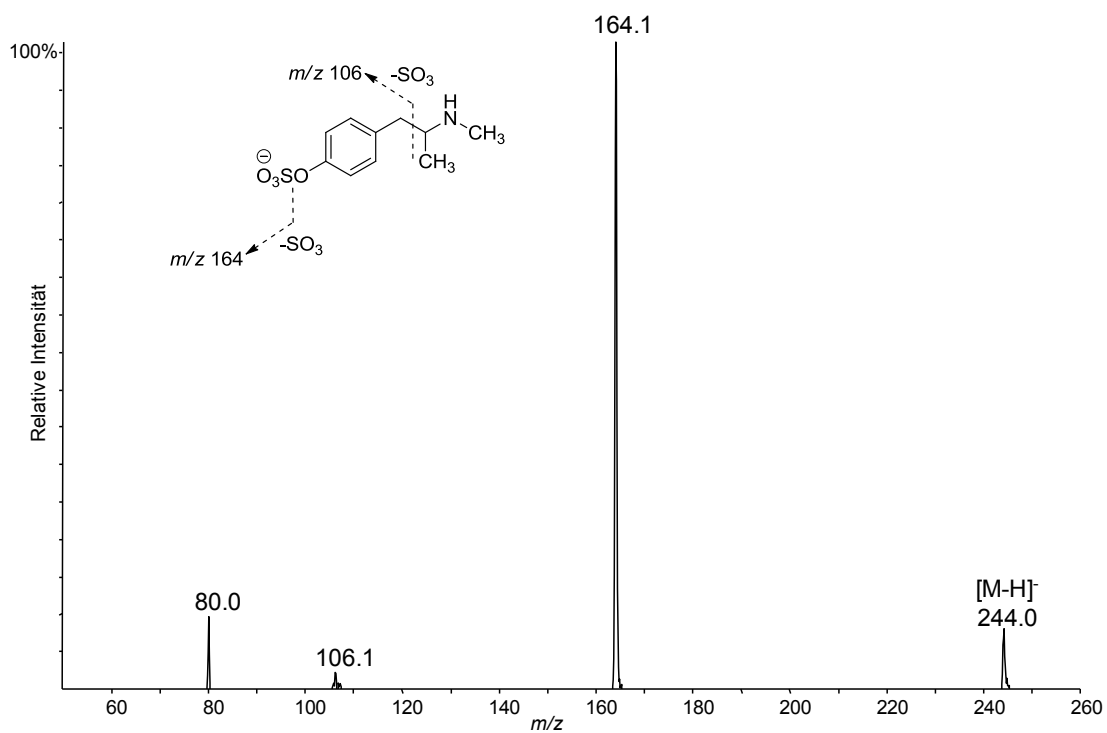


Abbildung 87 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des deprotonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von *p*-Hydroxymethamphetamine-Sulfokonjugat (**5-Sulf**, CE -30 eV)

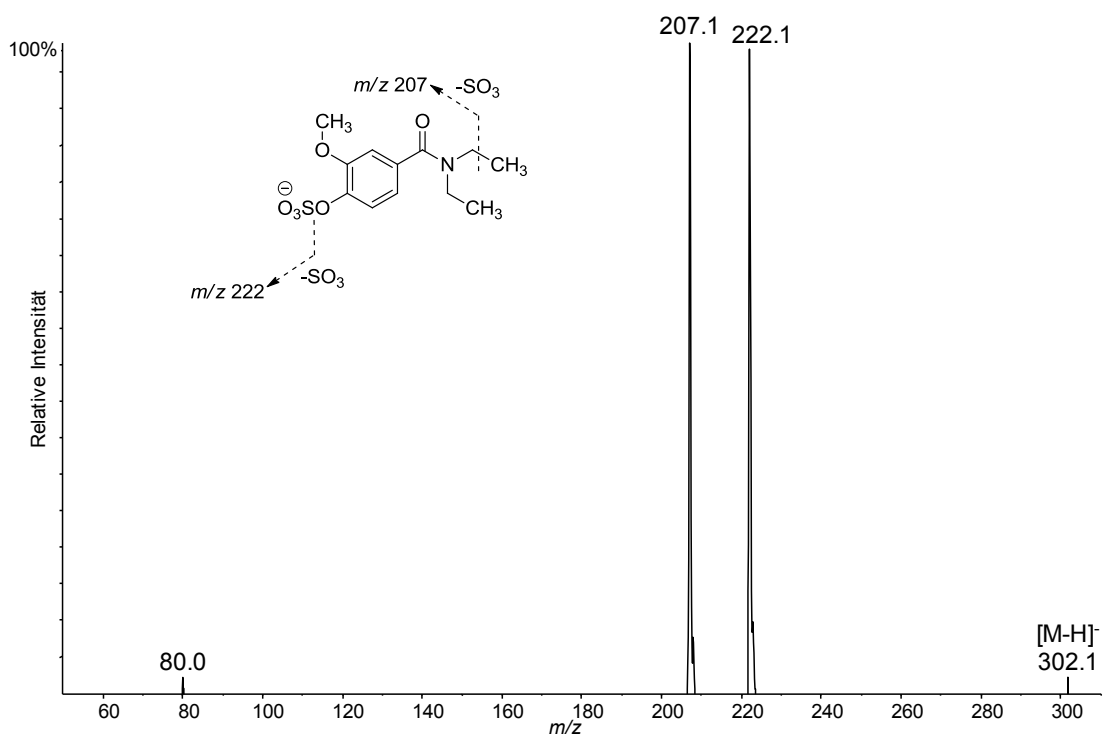


Abbildung 88 Produktionenspektrum (EPI; QTRAP) des protonierten Quasimoleküliions  $[M-H]^-$  von Etamivan-Sulfokonjugat (**6-Sulf**, CE -30 eV)

## 7.3 NMR-Spektren

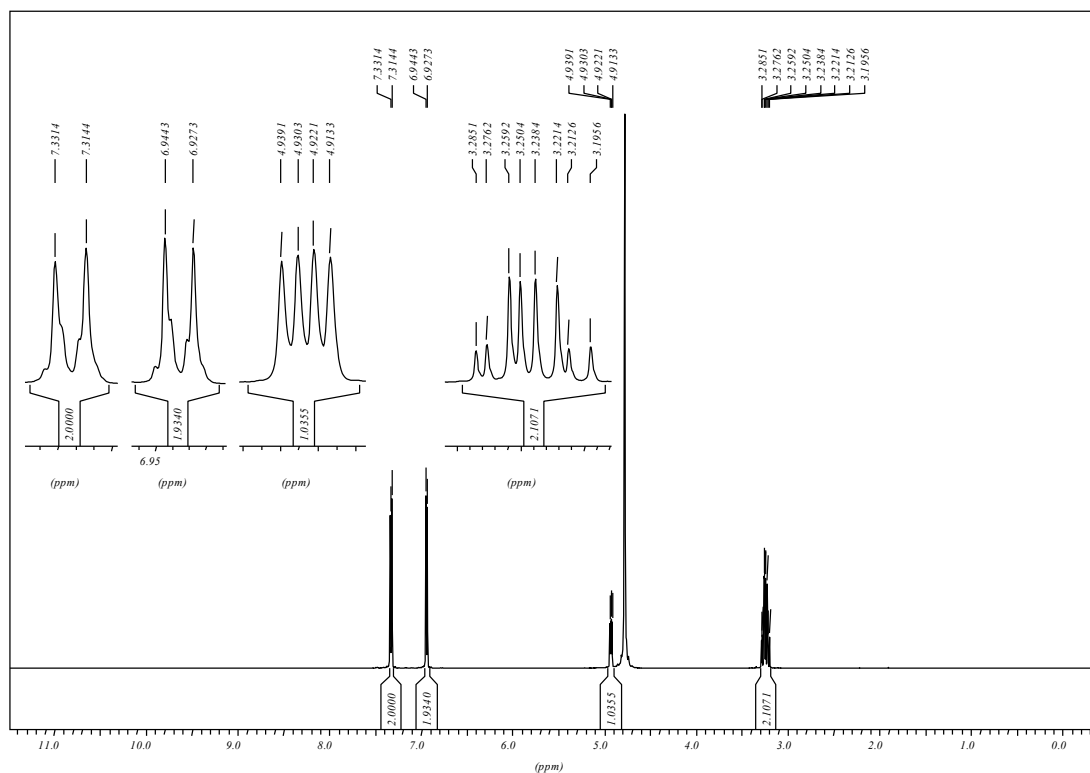


Abbildung 89 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Octopamin (**2**) aufgenommen in D<sub>2</sub>O

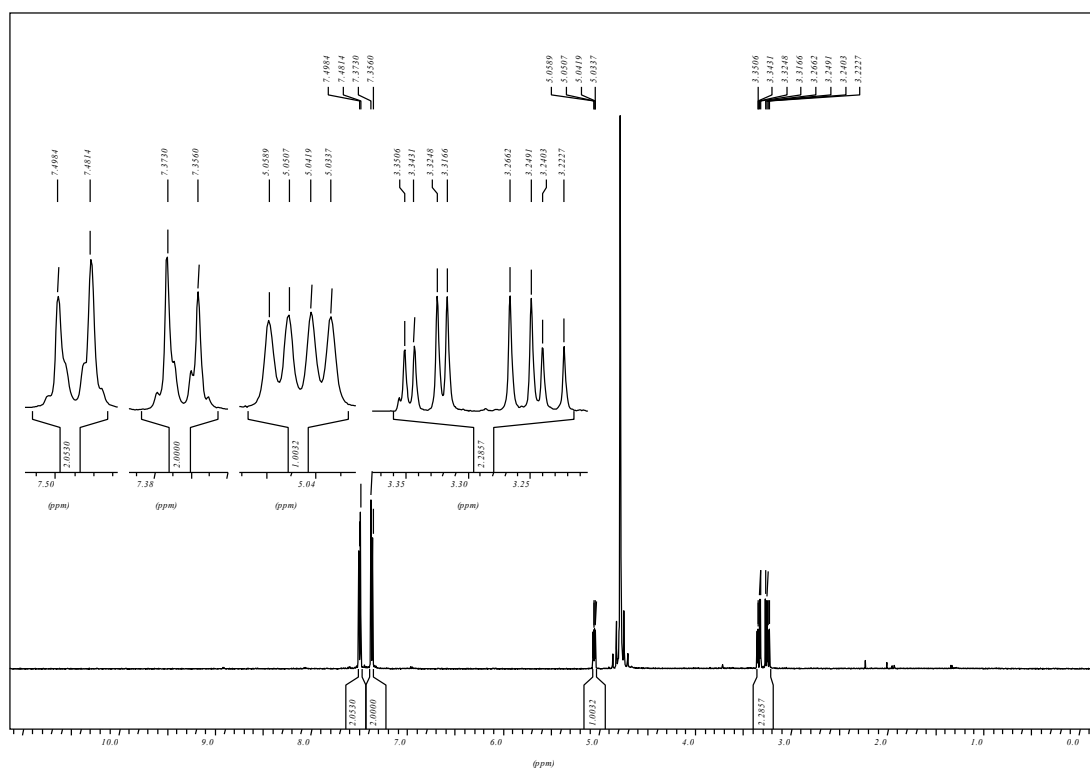
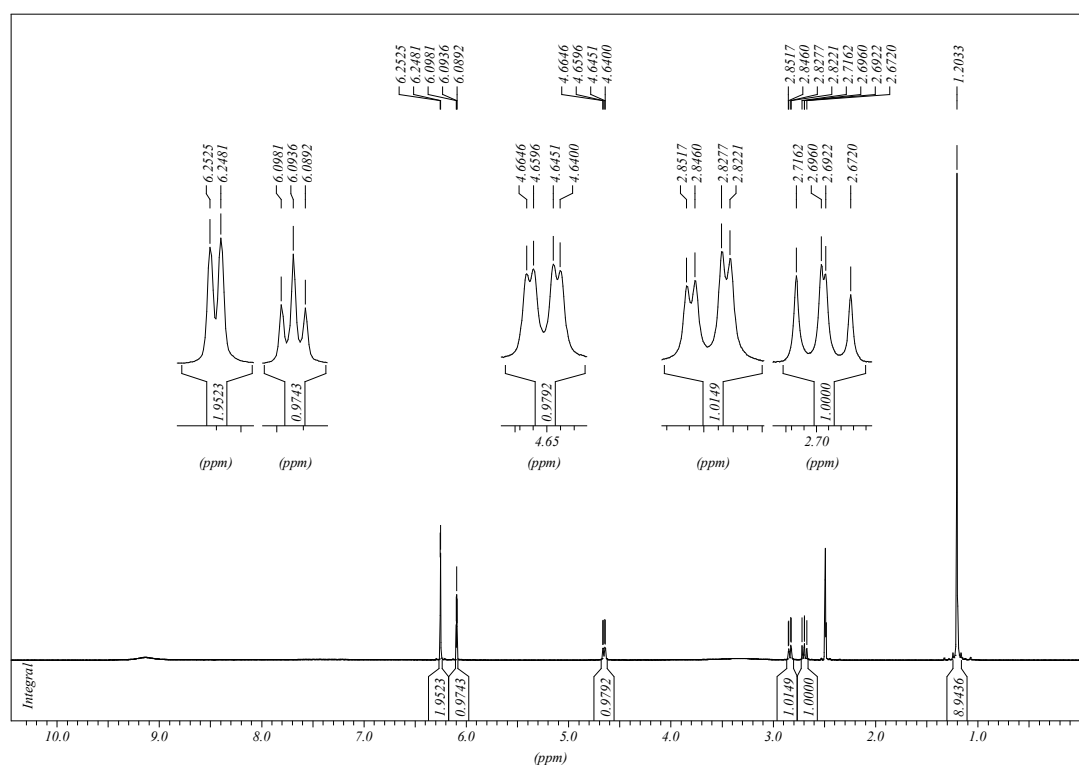
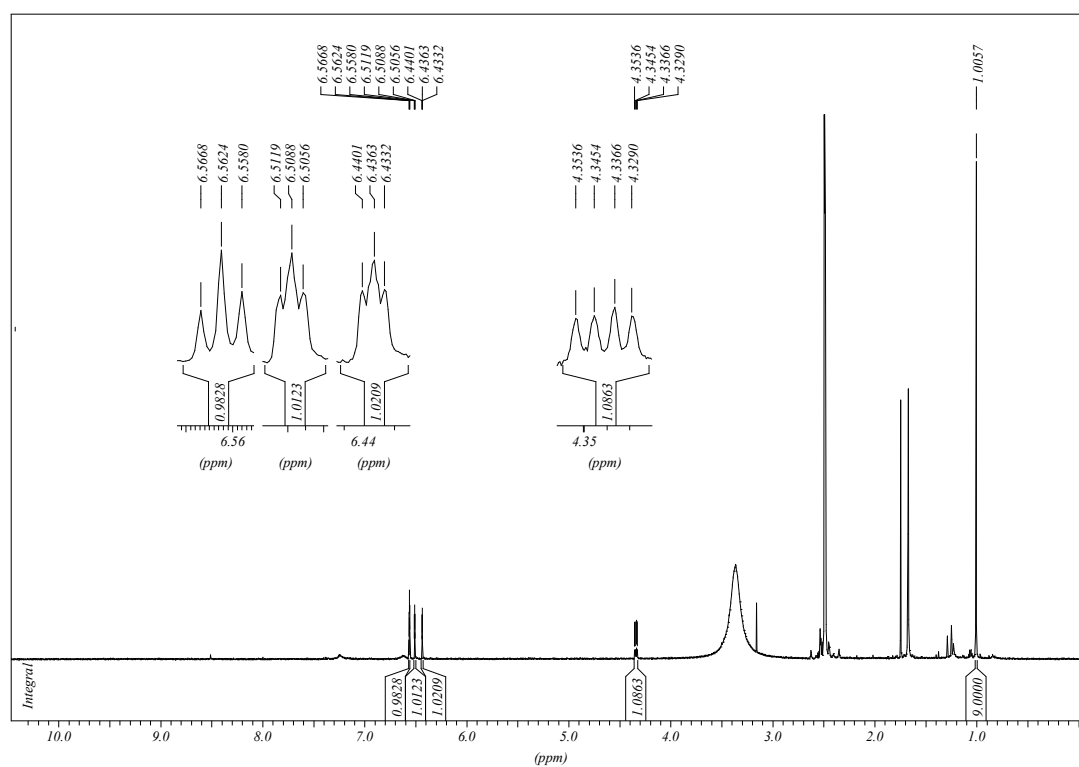


Abbildung 90 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Octopamin-Sulfonkonjugat (**2-Sulf**) aufgenommen in D<sub>2</sub>O

Abbildung 91 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Terbutalin (**7**) aufgenommen in DMSO-*d*<sub>6</sub>Abbildung 92 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Terbutalin-*mono*-Sulfokonjugat **1** (**7-Sulf1**) aufgenommen in DMSO-*d*<sub>6</sub>

## 7.4 *in vitro*-Untersuchung Fenoterol Sulfokonjugate

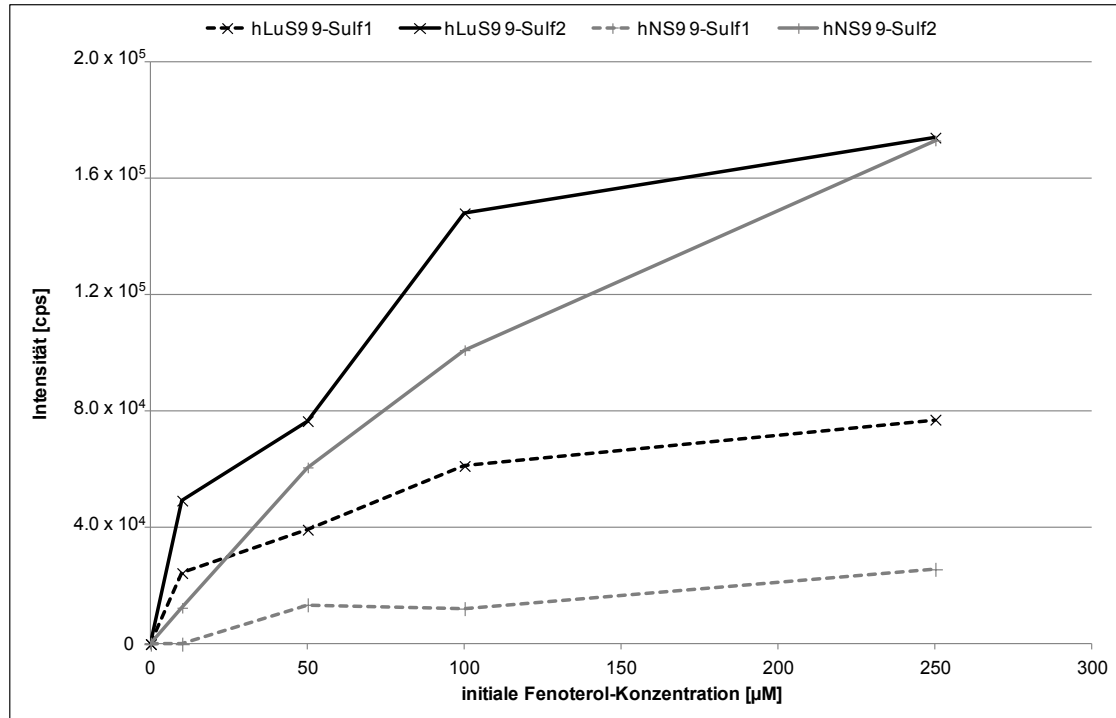


Abbildung 93 Bildung der Fenoterol-*mono*-Sulfokonjugate **9-Sulf1** und **9-Sulf2** durch Inkubation von hLuS9 und hNS9 mit Fenoterol (10-250  $\mu\text{M}$ ) und PAPS (50  $\mu\text{M}$ ) für 1,5 h bei 37° C



Tabelle 8 Intensität der Umsetzung von Fenoterol zu seinen Sulfokonjugaten unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe von hLeS9, hLeC oder hIS9 (Inkubationszeit, Ausgangskonzentration Fenoterol und PAPS, benutzte Gewebepräparationen)

Konzentration PAPS; Inkubations- zeit	Konzentration Fenoterol [μM]	Intensität [cps]											
		humane Leber S9-Fraktion				humanes Lebercytosol				humane Intestinum S9-Fraktion			
		9- Sulf1	9- Sulf2	9- Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1	9- Sulf1	9- Sulf2	9- Sulf3	Verhältnis 5-Sulf2 : 5-Sulf1	9- Sulf1	9- Sulf2	9- Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1
50 μM; 1 h	10	2 x 10 <sup>4</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>	-	4,0:1	2 x 10 <sup>4</sup>	9 x 10 <sup>4</sup>	-	5,2:1	1,5 x 10 <sup>5</sup>	3,2 x 10 <sup>5</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	2,1:1
	50	6 x 10 <sup>4</sup>	3,8 x 10 <sup>5</sup>	-	6,0:1	3 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	-	5,0:1	4,5 x 10 <sup>5</sup>	7,6 x 10 <sup>5</sup>	-	1,7:1
	100	7 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>	-	6,2:1	7 x 10 <sup>4</sup>	5,4 x 10 <sup>5</sup>	-	7,4:1	4,6 x 10 <sup>5</sup>	7,7 x 10 <sup>5</sup>	-	1,7:1
	250	3 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	-	5,1:1	1,0 x 10 <sup>5</sup>	1,04 x 10 <sup>5</sup>	-	10:1	5,1 x 10 <sup>5</sup>	8,1 x 10 <sup>5</sup>	-	1,6:1
100 μM; 1 h	50	5 x 10 <sup>4</sup>	2,0 x 10 <sup>5</sup>	-	4,0:1	5 x 10 <sup>4</sup>	2,9 x 10 <sup>5</sup>	-	6,0:1	5,3 x 10 <sup>5</sup>	9,8 x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	1,9:1
50 μM; 1,5h	10	2 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	-	5,4:1	7 x 10 <sup>4</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	-	5,9:1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	3,8 x 10 <sup>5</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	2,6:1
	50	8 x 10 <sup>4</sup>	4,1 x 10 <sup>5</sup>	-	5,3:1	9 x 10 <sup>4</sup>	6,3 x 10 <sup>5</sup>	-	6,8:1	4,2 x 10 <sup>5</sup>	7,3 x 10 <sup>5</sup>	9 x 10 <sup>3</sup>	1,8:1
	100	9 x 10 <sup>4</sup>	4,9 x 10 <sup>5</sup>	-	5,5:1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	8,3 x 10 <sup>5</sup>	-	6,0:1	5,2 x 10 <sup>5</sup>	8,4 x 10 <sup>5</sup>	-	1,6:1
	250	4 x 10 <sup>4</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup>	-	6,3:1	1,6 x 10 <sup>5</sup>	1,34 x 10 <sup>6</sup>	-	8,5:1	4,9 x 10 <sup>5</sup>	7,8 x 10 <sup>5</sup>	-	1,6:1
100 μM; 1,5 h	50	9 x 10 <sup>4</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>	-	2,8:1	7 x 10 <sup>4</sup>	4,7 x 10 <sup>5</sup>	-	6,3:1	6,0 x 10 <sup>5</sup>	1,15 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	1,9:1
50 μM; 2 h	10	3 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	-	4,5:1	3 x 10 <sup>4</sup>	2,1 x 10 <sup>5</sup>	-	6,3:1	1,5 x 10 <sup>5</sup>	3,4 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>	2,3:1
	50	1,1 x 10 <sup>5</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup>	-	5,2:1	1,0 x 10 <sup>5</sup>	7,8 x 10 <sup>5</sup>	-	7,5:1	4,5 x 10 <sup>5</sup>	8,4 x 10 <sup>5</sup>	-	1,9:1
	100	1,3 x 10 <sup>5</sup>	6,7 x 10 <sup>5</sup>	-	5,2:1	1,4 x 10 <sup>5</sup>	9,1 x 10 <sup>5</sup>	-	6,4:1	5,5 x 10 <sup>5</sup>	7,7 x 10 <sup>5</sup>	-	1,4:1
	250	6 x 10 <sup>4</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>	-	4,3:1	1,6 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	-	8,8:1	5,4 x 10 <sup>5</sup>	7,3 x 10 <sup>5</sup>	-	1,3:1
100 μM; 2 h	50	7 x 10 <sup>4</sup>	4,4 x 10 <sup>5</sup>	-	6,5:1	1,0 x 10 <sup>5</sup>	6,2 x 10 <sup>5</sup>	-	6,2:1	5,9 x 10 <sup>5</sup>	1,12 x 10 <sup>6</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	1,9:1

Tabelle 9 Intensität der Umsetzung von Fenoterol zu seinen Sulfokonjugaten unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe von hLuS9 oder hNS9 (Inkubationszeit, Ausgangskonzentration Fenoterol und PAPS, benutzte Gewebepräparationen)

Konzentration PAPS; Inkubations- zeit	Konzentration Fenoterol [μM]	Intensität [cps]							
		humane Lungen S9-Fraktion				Humane Nieren S9-Fraktion			
		9-Sulf1	9-Sulf2	9-Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1	9-Sulf1	9-Sulf2	9-Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1
50 μM; 1 h	10	1 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	-	2,4:1	3 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>	-	3,3:1
	50	6 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	-	1,9:1	1 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	-	3,2:1
	100	1,1 x 10 <sup>5</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	-	1,8:1	1 x 10 <sup>4</sup>	6 x 10 <sup>4</sup>	-	4,6:1
	250	1,0 x 10 <sup>5</sup>	2,7 x 10 <sup>5</sup>	-	2,7:1	2 x 10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	-	7,5:1
100 μM; 1 h	50	5 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	-	2,1:1	1,0 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	-	3,4:1
50 μM; 1,5h	10	2 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	-	2,0:1	-	1 x 10 <sup>4</sup>	-	-
	50	4 x 10 <sup>4</sup>	8 x 10 <sup>4</sup>	-	1,9:1	1 x 10 <sup>4</sup>	6 x 10 <sup>4</sup>	-	4,5:1
	100	6 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	-	2,4:1	1 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	-	8,3:1
	250	8 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	-	2,3:1	3 x 10 <sup>4</sup>	1,7 x 10 <sup>5</sup>	-	6,7:1
100 μM; 1,5 h	50	3 x 10 <sup>4</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>	-	1,9:1	1 x 10 <sup>4</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	-	3,8:1
50 μM; 2 h	10	7 x 10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>4</sup>	-	2,4:1	-	2 x 10 <sup>4</sup>	-	-
	50	1 x 10 <sup>4</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	-	2,4:1	2 x 10 <sup>4</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>	-	3,7:1
	100	5 x 10 <sup>4</sup>	9 x 10 <sup>4</sup>	-	1,6:1	3 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	-	4,8:1
	250	5 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>5</sup>	-	2,0:1	4 x 10 <sup>4</sup>	2,6 x 10 <sup>5</sup>	-	6,8:1
100 μM; 2 h	50	2 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	-	1,8:1	2 x 10 <sup>4</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>	-	3,9:1

Tabelle 10 Intensität der Umsetzung von Fenoterol zu seinen Sulfokonjugaten unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe von SULT1A1 oder SULT1A3 (Inkubationszeit, Ausgangskonzentration Fenoterol und PAPS, benutzte Sulfotransferasen)

Konzentration PAPS; Inkubationszeit	Konzentration Fenoterol [μM]	Intensität [cps]							
		rekombinante humane SULT1A1				rekombinante humane SULT1A3			
		9-Sulf1	9-Sulf2	9-Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1	9-Sulf1	9-Sulf2	9-Sulf3	Verhältnis 9-Sulf2 : 9-Sulf1
50 μM; 1 h	10	2 x 10 <sup>4</sup>	6,1 x 10 <sup>5</sup>	-	37:1	1,2 x 10 <sup>5</sup>	3,6 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	3,0:1
	50	1,1 x 10 <sup>5</sup>	2,09 x 10 <sup>6</sup>	-	19:1	8,6 x 10 <sup>5</sup>	1,52 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	1,8:1
	100	1,4 x 10 <sup>5</sup>	2,51 x 10 <sup>6</sup>	-	18:1	9,0 x 10 <sup>5</sup>	1,48 x 10 <sup>6</sup>	-	1,6:1
	250	1,6 x 10 <sup>5</sup>	3,14 x 10 <sup>6</sup>	-	20:1	8,5 x 10 <sup>5</sup>	1,38 x 10 <sup>6</sup>	-	1,6:1
100 μM; 1 h	50	1,1 x 10 <sup>5</sup>	2,3 x 10 <sup>6</sup>	-	21:1	7,6 x 10 <sup>5</sup>	1,79 x 10 <sup>6</sup>	2,4 x 10 <sup>5</sup>	2,4:1
50 μM; 1,5h	10	1 x 10 <sup>4</sup>	5,9 x 10 <sup>5</sup>	3 x 10 <sup>4</sup>	45:1	7 x 10 <sup>4</sup>	3,5 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	4,8:1
	50	9 x 10 <sup>4</sup>	2,04 x 10 <sup>6</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>	23:1	7,4 x 10 <sup>5</sup>	1,46 x 10 <sup>6</sup>	5 x 10 <sup>4</sup>	2,0:1
	100	1,2 x 10 <sup>5</sup>	2,16 x 10 <sup>6</sup>	-	19:1	8,5 x 10 <sup>5</sup>	1,37 x 10 <sup>6</sup>	-	1,6:1
	250	1,8 x 10 <sup>5</sup>	2,53 x 10 <sup>6</sup>	-	14:1	9,1 x 10 <sup>5</sup>	1,31 x 10 <sup>6</sup>	-	1,4:1
100 μM; 1,5 h	50	8 x 10 <sup>4</sup>	1,93 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	24:1	6,2 x 10 <sup>5</sup>	1,51 x 10 <sup>6</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>	2,4:1
50 μM; 2 h	10	1 x 10 <sup>4</sup>	5,4 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	39:1	7 x 10 <sup>4</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	4,6:1
	50	8 x 10 <sup>4</sup>	1,77 x 10 <sup>6</sup>	7 x 10 <sup>4</sup>	22:1	7,4 x 10 <sup>5</sup>	1,43 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	1,9:1
	100	1,2 x 10 <sup>5</sup>	2,18 x 10 <sup>6</sup>	-	18:1	7,8 x 10 <sup>5</sup>	1,25 x 10 <sup>6</sup>	-	1,6:1
	250	1,5 x 10 <sup>5</sup>	2,29 x 10 <sup>6</sup>	-	16:1	9,3 x 10 <sup>5</sup>	1,35 x 10 <sup>6</sup>	-	1,4:1
100 μM; 2 h	50	7 x 10 <sup>4</sup>	1,98 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>5</sup>	28:1	6,4 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>	4,6 x 10 <sup>5</sup>	2,5:1

## 7.5 Screeningprozedur

Tabelle 11 Chromatographische und massenspektrometrische Parameter für alle in Screeningprozedur enthaltenen Substanzen (entnommen aus Guddat et al.<sup>138</sup>)

No	Substanz	Substanzklasse	RT	RRT	Ionisations- modus	Precursor- Ion (m/z)	Produkt- Ion (m/z)	Kollisions- energie (eV)	Declustering Potential (V)
1	Acetazolamid	Diuretikum	4,22	0,78	-	221	83	-26	-50
2	Althiazid	Diuretikum	5,52	1,02	-	382	341	-30	-150
3	Amilorid	Diuretikum	4,12	0,76	+	230	171	30	100
4	Azosemid	Diuretikum	5,76	1,06	-	369	326	-30	-100
5	Bemethiazid	Diuretikum	5,70	1,05	-	400	294	-30	-150
6	Bendroflumethiazid	Diuretikum	5,74	1,06	-	420	289	-28	-150
7	Benzthiazid	Diuretikum	5,62	1,03	-	430	308	-30	-100
8	Bumetanid	Diuretikum	5,79	1,07	-	363	80	-30	-100
9	Buthiazid	Diuretikum	5,56	1,02	-	352	269	-40	-150
10	Chlorazanyl	Diuretikum	5,41	1,00	-	220	151	-30	-50
11	Chlorothiazid	Diuretikum	4,31	0,79	-	294	214	-30	-150
12	Chlorthalidon	Diuretikum	5,12	0,94	-	337	146	-30	-100
13	Clopamid	Diuretikum	5,28	0,97	-	344	78	-75	-150
14	Clorexolon	Diuretikum	5,58	1,03	-	327	78	-60	-150
15	Cyclopenthiazid	Diuretikum	5,76	1,06	-	378	269	-30	-150
16	Cyclothiazid	Diuretikum	5,67	1,04	-	388	269	-30	-150

No	Substanz	Substanzklasse	RT	RRT	Ionisations- modus	Precursor- Ion ( <i>m/z</i> )	Produkt- Ion ( <i>m/z</i> )	Kollisions- energie (eV)	Declustering Potential (V)
17	Diclofenamid	Diuretikum	5,12	0,94	-	303	78	-40	-100
18	Epithiazid	Diuretikum	5,58	1,03	-	424	300	-30	-150
19	Ethacrynsäure	Diuretikum	5,86	1,08	-	301	243	-30	-50
20	Ethiazid	Diuretikum	5,13	0,94	-	324	78	-50	-150
21	Furosemid	Diuretikum	5,50	1,01	-	329	205	-34	-25
22	Hydrochlorothiazid	Diuretikum	4,50	0,83	-	296	269	-25	-100
23	Hydroflumethiazid	Diuretikum	4,94	0,91	-	330	239	-30	-150
24	Indapamid	Diuretikum	5,59	1,03	-	364	189	-30	-100
25	Mefrusid (IS)	Diuretikum	5,43	1,00	-	381	78	-80	-100
26	Mefrusid Metabolit (5-oxo-Mefrusid)	Diuretikum	5,24	0,97	-	395	78	-60	-100
27	Methyclothiazid	Diuretikum	5,42	1,00	-	358	322	-30	-100
28	Meticran	Diuretikum	4,94	0,91	-	274	210	-32	-120
29	Metolazon	Diuretikum	5,48	1,01	-	364	257	-30	-50
30	Muzolimin	Diuretikum	5,50	1,01	-	270	97	-30	-50
31	Piretanid	Diuretikum	5,68	1,05	-	361	80	-30	-100

No	Substanz	Substanzklasse	RT	RRT	Ionisations- modus	Precursor- Ion ( <i>m/z</i> )	Produkt- Ion ( <i>m/z</i> )	Kollisions- energie (eV)	Declustering Potential (V)
32	Polythiazid	Diuretikum	5,73	1,06	-	438	204	-50	-100
33	Torasemid	Diuretikum	5,25	0,97	-	347	262	-30	-50
34	Trichlormethiazid	Diuretikum	5,36	0,99	-	378	242	-30	-100
35	Xipamid	Diuretikum	5,76	1,06	-	353	127	-30	-100
36	Fentanyl	Narkotikum	4,92	0,91	+	337	105	47	120
37	Methadon	Narkotikum	5,12	0,94	+	310	265	21	96
38	Oxycodon	Narkotikum	4,28	0,79	+	316	241	47	120
39	Pethidin	Narkotikum	4,72	0,87	+	248	220	29	151
40	Benzoyllecgonin	Stimulanz	4,75	0,87	-	288	121	-22	-50
			4,75	0,87	+	290	168	27	50
41	Ephedrin	Stimulanz	3,84	0,71	+	166	148	15	15
42	<b>6-Sulf</b>	Stimulanz	5,02	0,92	-	302	207	-40	-95
43	Modafinilsäure	Stimulanz	5,39	0,99	-	273	167	-30	-100
44	Norephedrin	Stimulanz	2,68	0,49	+	152	134	15	15
45	Norpseudoephedrin	Stimulanz	3,34	0,62	+	152	134	15	15
46	<b>4-Sulf</b>	Stimulanz	3,85	0,71	-	230	106	-40	-80

No	Substanz	Substanzklasse	RT	RRT	Ionisations- modus	Precursor- ion ( <i>m/z</i> )	Produkt- ion ( <i>m/z</i> )	Kollisions- energie (eV)	Declustering Potential (V)
47	<b>5-Sulf</b>	Stimulanz	3,87	0,71	-	244	106	-40	-40
48	Pseudoephedrin	Stimulanz	3,96	0,73	+	166	148	15	15
49	Ritalinsäure	Stimulanz	4,48	0,83	-	218	174	-30	-100
50	Probenecid	Urikosurikum	5,81	1,07	-	284	140	-30	-50
51	Formoterol	$\beta_2$ -Agonist	4,63	0,85	+	345	149	25	15
52	Salbutamol	$\beta_2$ -Agonist	3,93	0,72	+	240	148	20	15
53	Salmeterol	$\beta_2$ -Agonist	5,15	0,95	+	416	232	30	15

Tabelle 12 Validierungsergebnisse der gesamten Screeningprozedur (entnommen aus Guddat et al.<sup>138</sup>)

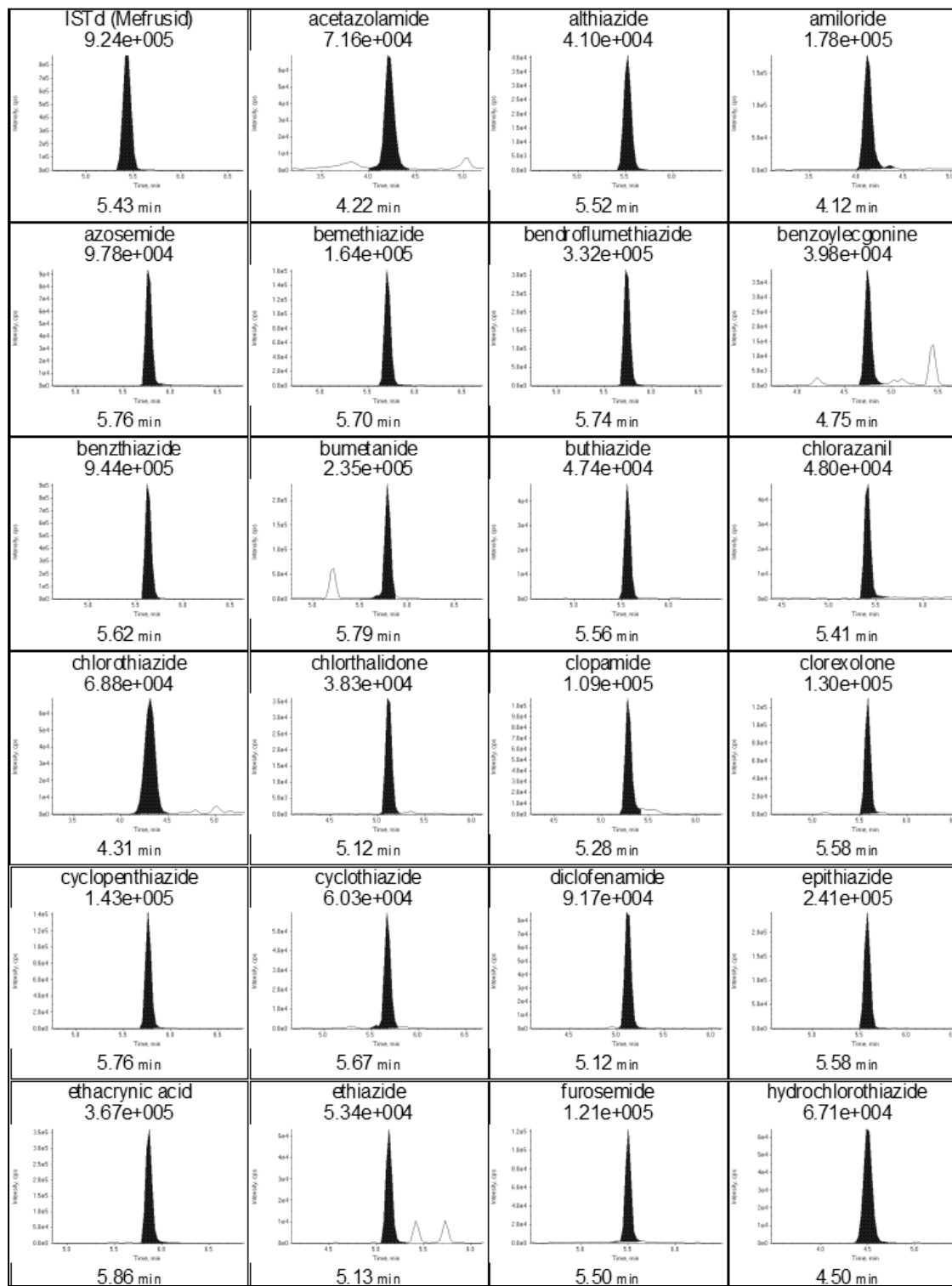
No	Substanz	MRPL <sup>113</sup>	LOD	Präzision	Konzentration			<i>intraday</i> -Präzision			<i>interday</i> -Präzision		
				RRT (n=6)	(ng/mL)			CV (%) (n=6/6/6)			CV (%) (n=18/18/18)		
		(ng/mL)	(ng/mL)	CV (%)	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>
1	Acetazolamid	250	25	1,55	500	250	100	5,25	7,24	5,84	2,50	2,23	4,78
2	Althiazid	250	10	0,28	500	250	100	6,67	10,53	10,82	6,74	1,26	6,26
3	Amilorid	250	25	0,37	500	250	100	16,64	5,59	9,85	7,22	3,40	5,93
4	Azosemid	250	2	0,48	500	250	100	5,57	8,04	10,11	3,22	1,75	5,15
5	Bemethiazid	250	5	0,23	500	250	100	7,19	8,63	7,56	4,51	1,07	2,96
6	Bendroflumethiazid	250	2	0,17	500	250	100	5,36	7,62	7,76	7,80	1,45	5,83
7	Benzthiazid	250	1	0,11	500	250	100	8,84	9,81	9,95	2,20	3,86	5,42
8	Bumetanid	250	1	0,22	500	250	100	6,87	6,92	7,72	3,91	1,74	6,92
9	Buthiazid	250	5	0,18	500	250	100	4,52	7,61	10,86	4,93	2,83	2,17
10	Chlorazanyl	250	5	0,15	500	250	100	10,22	10,83	9,80	15,30	6,02	18,21
11	Chlorothiazid	250	25	1,65	500	250	100	7,65	7,81	9,60	5,88	1,50	4,75
12	Chlorthalidon	250	5	0,29	500	250	100	6,62	7,27	10,50	4,43	0,95	2,02
13	Clopamid	250	2	0,21	500	250	100	7,20	10,30	4,77	8,85	10,74	5,34
14	Clorexolon	250	2	0,17	500	250	100	5,60	9,21	6,66	2,25	3,39	4,32
15	Cyclopenthiazid	250	2	0,16	500	250	100	6,39	9,83	9,32	3,55	1,70	3,47
16	Cyclothiazid	250	2	0,19	500	250	100	4,12	8,87	9,69	5,33	1,86	2,59

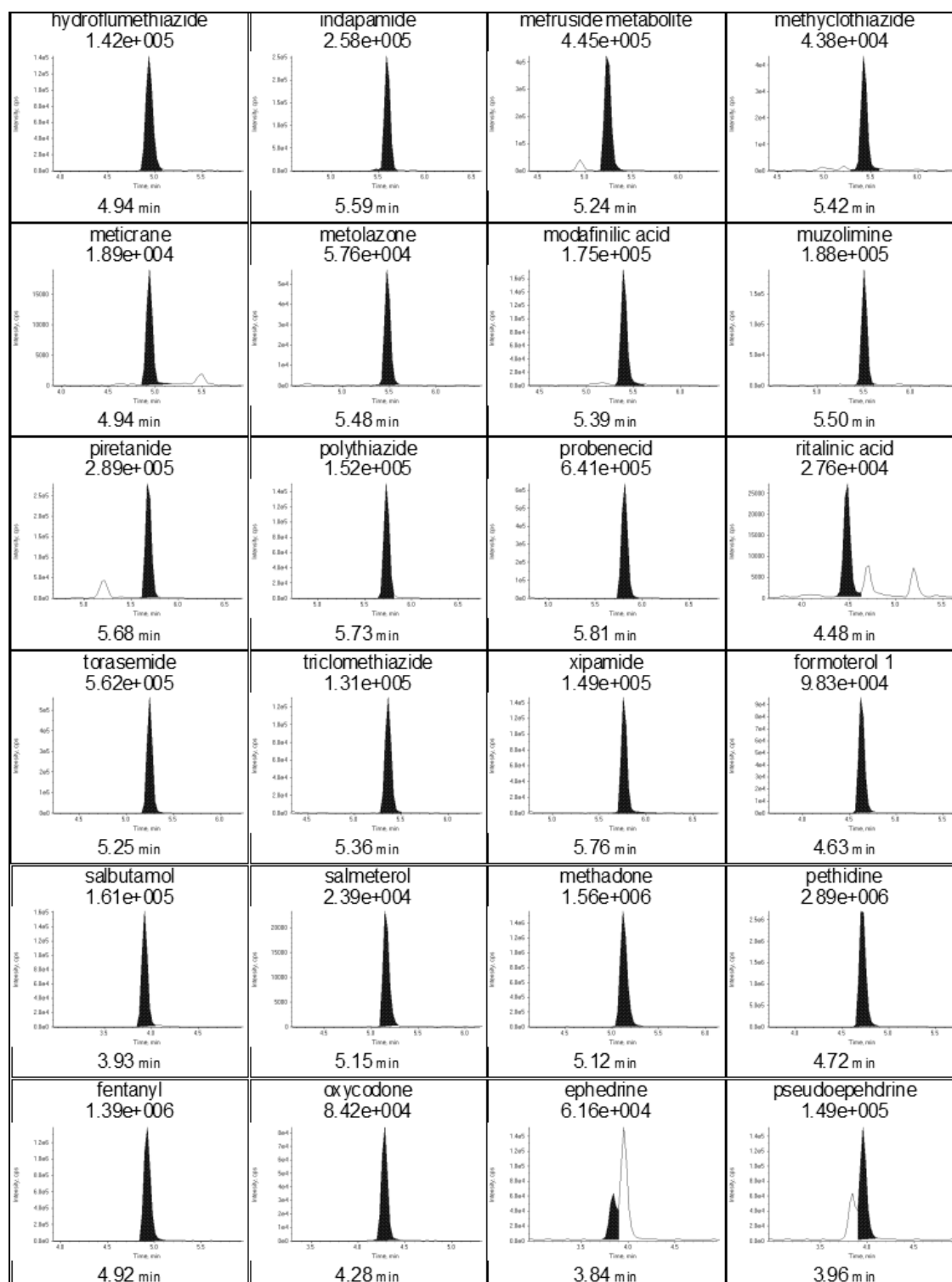


No	Substanz	MRPL <sup>113</sup>	LOD	Präzision	Konzentration			intraday-Präzision			interday-Präzision		
				RRT (n=6)	(ng/mL)			CV (%) (n=6/6/6)			CV (%) (n=18/18/18)		
		(ng/mL)	(ng/mL)	CV (%)	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>
17	Diclofenamid	250	2	0,38	500	250	100	5,24	7,11	8,64	3,77	1,83	6,37
18	Epithiazid	250	5	0,16	500	250	100	9,47	10,43	8,62	9,45	5,64	4,17
19	Ethacrynsäure	250	5	0,35	500	250	100	6,28	8,65	5,81	1,28	3,08	3,44
20	Ethiazid	250	5	0,39	500	250	100	5,92	6,83	8,70	5,39	6,45	5,75
21	Furosemid	250	20	0,33	500	250	100	4,94	8,65	7,66	1,07	1,97	6,48
22	Hydrochlorothiazid	250	3	1,25	500	250	100	4,99	6,61	7,13	3,10	1,79	5,05
23	Hydroflumethiazid	250	2	0,58	500	250	100	5,73	6,89	11,96	5,33	2,26	8,37
24	Indapamid	250	2	0,25	500	250	100	5,24	8,23	6,89	1,18	3,16	2,50
25	Mefrusid (IS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Mefrusid Metabolit (5-oxo-Mefrusid)	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Methyclothiazid	250	10	0,23	500	250	100	5,44	8,15	9,97	3,42	2,15	8,17
28	Meticran	250	20	1,14	500	250	100	6,96	5,15	13,65	2,31	5,03	6,37
29	Metolazon	250	3	0,18	500	250	100	6,58	7,40	8,29	1,64	2,03	4,16
30	Muzolimin	250	5	0,19	500	250	100	4,71	7,18	9,00	1,07	1,47	5,29
31	Piretanid	250	5	0,24	500	250	100	4,62	10,03	5,63	1,57	3,30	2,90

No	Substanz	MRPL <sup>113</sup>	LOD	Präzision			Konzentration			<i>intraday</i> -Präzision			<i>interday</i> -Präzision		
				RRT ( <i>n</i> =6)			(ng/mL)			CV (%) ( <i>n</i> =6/6/6)			CV (%) ( <i>n</i> =18/18/18)		
				(ng/mL)	(ng/mL)	CV (%)	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>
32	Polythiazid	250	1	0,13	500	250	100	7,17	7,32	9,29	1,92	3,21	8,48		
33	Torasemid	250	1	0,23	500	250	100	7,21	12,88	11,88	6,12	5,00	5,46		
34	Trichlormethiazid	250	2	0,26	500	250	100	6,60	9,34	11,80	7,77	9,70	9,83		
35	Xipamid	250	2	0,16	500	250	100	7,45	7,26	11,50	6,28	7,05	5,41		
36	Fentanyl	10	1	0,07	20	10	5	10,60	7,75	5,46	13,64	18,75	17,01		
37	Methadon	200	1	0,05	500	200	100	5,60	8,01	6,53	3,87	14,67	19,91		
38	Oxycodon	200	5	0,29	500	200	100	7,58	6,43	6,39	13,18	15,49	15,21		
39	Pethidin	200	1	0,10	500	200	100	9,70	6,04	6,24	10,47	5,42	6,85		
40	Benzoylecgonin	500	1-25	0,43	500	250	100	6,98	12,87	8,50	3,40	1,83	2,91		
41	Ephedrin	500	5	0,59	30 µg/mL	15 µg/mL	7,5 µg/mL	6,79	7,09	7,13	7,84	9,29	8,53		
42	<b>6-Sulf</b>	500	25	0,05	1000	500	100	8,82	7,77	9,56	2,69	8,51	4,95		
43	Modafinilsäure	250	10	0,00	500	250	100	3,16	3,33	8,22	2,19	1,98	3,62		
44	Norephedrin	500	70	0,52	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	7,49	6,89	5,26	10,47	14,21	8,63		
45	Norpseudoephedrin	500	70	0,68	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	7,70	6,95	5,42	9,69	13,18	12,12		
46	<b>4-Sulf</b>	500	25	0,64	1000	500	100	7,92	6,49	11,12	4,35	15,88	11,73		
47	<b>5-Sulf</b>	500	25	0,57	1000	500	100	7,00	7,64	8,64	6,99	13,34	13,45		

No	Substanz	MRPL <sup>113</sup>	LOD	Präzision	Konzentration			<i>intraday</i> -Präzision			<i>interday</i> -Präzision		
				RRT ( <i>n</i> =6)	(ng/mL)			CV (%) ( <i>n</i> =6/6/6)			CV (%) ( <i>n</i> =18/18/18)		
		(ng/mL)	(ng/mL)	CV (%)	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>	QC <sub>hoch</sub>	QC <sub>mittel</sub>	QC <sub>niedrig</sub>
48	Pseudoephedrin	500	5	0,70	20 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	13,12	11,62	7,48	18,57	11,86	8,06
49	Ritalinsäure	500	70	0,06	500	250	100	6,99	14,33	13,98	6,01	3,02	5,22
50	Probenecid	250	1	0,30	500	250	100	7,25	6,26	7,22	2,59	1,59	2,07
51	Formoterol	100	5	0,12	250	100	50	9,35	8,29	8,41	3,71	12,64	13,54
52	Salbutamol	100	5	0,57	250	100	50	10,43	8,08	12,11	4,99	17,02	14,96
53	Salmeterol	100	5	0,10	250	100	50	7,14	12,62	9,70	12,83	3,40	14,33





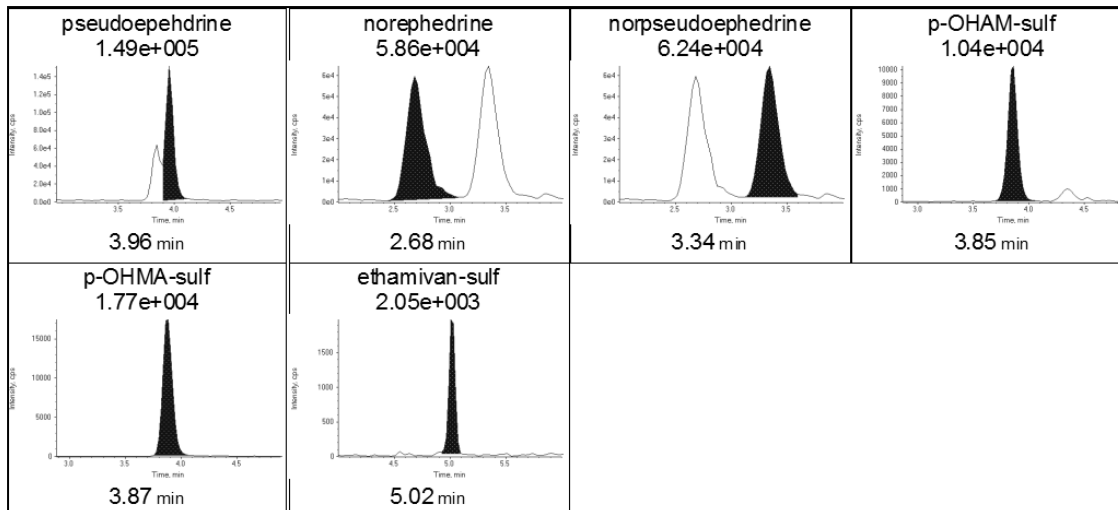


Abbildung 94 Extrahierte Ionenchromatogramme der Analyten in den Qualitätskontrollproben (Konzentration Diuretika 125 ng/mL;  $\beta_2$ -Agonisten 100 ng/mL; Narkotika 200 ng/mL; 500 ng/mL Stimulanzien und Stimulanzien-Sulfokongjugate) (entnommen aus Guddat et al.<sup>138</sup>)

## 7.6 Materialien

### 7.6.1 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Qualität	Quelle
3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat	≥60 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Aceton	≥99,5 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Acetonitril	99,9 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Ameisensäure	99 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniak (25 %)	p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat	p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Calciumcarbid	~80 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO- $d_6$ )	99,9 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Dichlormethan	99,9 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dideuteroxid (D <sub>2</sub> O)	99,9 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Diethylether	99,7 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	99 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	99 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Eisessig	p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	96 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethylacetat	99 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Kaliumcarbonat	100 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kieselgel	(DC-Qualität)	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Kieselgel 60	reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	≥98 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Methanol	99,9 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
Natriumazid	reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nitrobenzaldehyd	98 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Oasis®, HLB 3mL (60mg) Cartridge		Waters (Milford, MA, USA)
Oasis®, HLB 6mL (200mg) Cartridge		Waters (Milford, MA, USA)
Propan-2-ol	99,5 %	VWR (Langenfeld, Deutschland)
<i>p</i> -Toluensulfonsäure	≥98,5 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Pyridin	99,9 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Salzsäure (32 %)		Merck (Darmstadt, Deutschland)
Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex	zur Synthese	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex	≥95 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
SERDOLIT® PAD I Festphase 0.1 - 0.2 mm		Serva (Heidelberg, Deutschland)
Strata™-X-CW 1ml, 30mg		Phenomonex (Aschaffenburg, Deutschland)
Sulfurylchlorid	97 %	Sigma (St. Louis, MO, USA)
<i>tert</i> -Butylmethylether	destilliert	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Toluen	99,8 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Trichlorethanol	≥99 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Trimethylaluminium-Lösung (2,0 M in Toluol)		Aldrich (Deisendorf, Deutschland)
Trimethylboroxin	99 %	Aldrich (Deisendorf, Deutschland)



### 7.6.2 Referenzverbindungen

Bezeichnung	Quelle
d <sub>3</sub> -Octopamin x HCl	C/D/N Isotopes (Quebec, Kanada)
Etamivan-Sulfokonjugat	Synthese institutsintern
Etilefrin x HCl	Troponwerke (Köln, Deutschland)
Fenoterol x HBr	Sigma (St. Louis, MA, USA)
Mefrusid	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Octopamin x HCl	Sigma (St. Louis, MA, USA)
<i>p</i> -Hydroxyephedrin-Sulfokonjugat	Synthese institutsintern
<i>p</i> -Hydroxymetamphetamin-Sulfokonjugat	Synthese institutsintern
<i>p</i> -Hydroxyamphetamin-Sulfokonjugat	Synthese institutsintern
Terbutalin x ½ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma (St. Louis, MA, USA)

### 7.6.3 Gewebe und Enzyme

Bezeichnung	Quelle
humane Intestinum S9-Fraktion	Xenotech (Lenexa, KS, USA)
humanes Leber-Cytosol	Sigma (St. Louis, MA, USA)
humane Leber S9-Fraktion	BD Gentest (Woburn, MA, USA)
humane Lungen S9-Fraktion (Nichtraucher)	Xenotech (Lenexa, KS, USA)
humane Nieren S9-Fraktion	Xenotech (Lenexa, KS, USA)
Sulfotransferase 1A1*1	Xenotech (Lenexa, KS, USA)
Sulfotransferase 1A3	Xenotech (Lenexa, KS, USA)